

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
AN DER SAUREN FORM DER SULFATASE
UNTER PHYLOGENETISCHEN UND
ONTOGENETISCHEN GESICHTSPUNKTEN**

Wilfried Mraz

1975

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN DER SAUREN FORM DER SULFATASE
UNTER PHYLOGENETISCHEN UND ONTOGENETISCHEN
GESICHTSPUNKTEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

 vorgelegt
von
Wilfried Mraz
aus
Reichenberg

1975

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. H. Autrum

2. Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung:

19. November 1975



Die vorliegende Arbeit wurde nach einer Arbeit über die Sulfatase A bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie (J. Neurochem. 20, 279 (1973)) in der Zeit von Oktober 1970 bis September 1974 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Autrum

sei gedankt für seine Unterstützung und großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Linzen

sei gedankt für seine Unterstützung und anregende Diskussion dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz

bin ich für seine Betreuung, seine Anregungen und wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit und zu einem tieferen biologisch-chemischen Verständnis beigetragen haben, zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	ERGEBNISSE	5
2.1	Extraktion und Anreicherung der Sulfatasen	5
2.2	Eigenschaften der Sulfatasen verschiedener Species	7
2.2.1	Physikalische und chemische Eigenschaften der Sulfatasen	11
2.2.1.1.	Multiple Formen der Sulfatasen. Isoelektrische Punkte	11
2.2.1.2.	Monomer- und Oligomerformen der Sulfatasen. Molekulargewichte	14
2.2.1.3.	Thermostabilität der Sulfatasen	18
2.2.1.4.	Glykoproteinnatur der Sulfatasen	19
2.2.2.	Substratspezifitäten der Sulfatasen	21
2.2.3.	Eigenschaften der katalytischen Reaktion der Sulfatasen	24
2.2.3.1.	Einfluß von Detergentien und der Ionenstärke auf die Aktivität der Sulfatasen	24
2.2.3.2.	Einfluß der Inkubationszeit und der Enzymkonzentration auf die Aktivität der Sulfatasen	26
2.2.3.3.	Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Sulfatasen	28
2.2.3.4.	Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Sulfatasen	35
2.2.3.5.	Einfluß einiger Inhibitoren auf die Aktivität der Sulfatasen	41

2.3.	Intrazelluläre Lokalisation der Sulfatasen im Vergleich mit anderen sauren Hydrolasen	43
2.3.1.	Subzelluläre Lokalisation der Sulfatasen im Rattengehirn	43
2.3.2.	Nachweis "lysosomaler" Enzyme bei Wirbellosen	47
2.4.	Altersabhängige Veränderungen der Sulfatasen der Ratte	48
2.4.1.	Postnatale Veränderungen der Aktivität der Sulfatasen im Rattengehirn	48
2.4.2.	Postnatale Veränderungen der intrazellulären Verteilung der Sulfatasen im Rattengehirn	52
2.4.3.	Postnatale Veränderungen der Eigenschaften der Sulfatasen	54
3.	DISKUSSION	55
4.	MATERIAL UND METHODEN	67
4.1.	Tiere	67
4.2.	Chemikalien	67
4.2.1.	Reagenzien und Adsorbenzien	67
4.2.2.	Substrate	68
4.3.	Enzymbestimmungsmethoden	69
4.3.1.	Sulfatase	69
4.3.1.1.	Aktivitätsbestimmung der Sulfatase mit Nitro-catecholsulfat (2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat, NCS) als Substrat	69
4.3.1.2.	Aktivitätsbestimmung der Sulfatase mit [^3H]-Cerebrosidsulfat (^3H CS) als Substrat	69
4.3.1.3.	Bestimmung der Parameter der Sulfatase-Reaktion	70
4.3.2.	B-N-Acetylglucosaminidase	71
4.3.3.	Saure Phosphatase	71
4.4.	Proteinbestimmung	71
4.5.	Trennung multipler Formen und Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Sulfatasen	71

4.6.	Trennung oligomerer Formen und Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte der Sulfatasen	72
4.7.	Bestimmung der Thermostabilität der Sulfatasen	73
4.8.	Nachweis der Glykoproteinnatur der Sulfatasen	73
4.9.	Anreicherung der Sulfatasen	73
4.10.	Gewebefraktionierung	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATURVERZEICHNIS	80

ENZYME

Arylsulfatase, Arylsulfat-Sulfohydrolase (EC 3.1.6.1)

Cerebrosidsulfatase, Cerebrosid-3-sulfat-Sulfohydrolase (EC 3.1.6.8)

Galactosylceramid- β -D-galactosidase, D-Galactosyl-N-acylsphingosin-Galactohydrolase (EC 3.2.1.46)

Acylsphingosindeacylase, N-Acylsphingosin-Amidohydrolase (EC 3.5.1.23)

Saure Phosphatase, Orthophosphorsäuremonoester-Phosphohydrolase (saures Optimum) (EC 3.1.3.2)

β -N-Acetylglucosaminidase, 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucosid-Acetamidodesoxyglucohydrolase (EC 3.2.1.30)

ENZYMEINHEIT

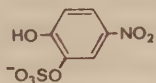
Als Enzymeinheit (U) ist diejenige Enzymmenge definiert, die bei 37°C 1 μ Mol Substrat pro Min. hydrolysiert.

ABKÜRZUNGEN

NCS	Nitrocatecholsulfat, 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat
NC	Nitrocatechol, p-Nitrobrenzkatechin
CS	Cerebrosidsulfat, Cerebrosid-3-sulfat, $\text{Cer1} \rightarrow 1\beta\text{Gal3} \rightarrow \text{SO}_3^-$
[^3H]CS	Cerebrosidsulfat, tritiummarkiert
Cer	Ceramid, N-Acylsphingosin
Gal	Galactose
ConA	Concanavalin A
RSA	Relative spezifische Aktivität

1. EINLEITUNG

Arylsulfatasen (EC 3.1.6.1) sind seit mehr als einem halben Jahrhundert bekannt (31) und wurden, wie der Name dieser Enzyme andeutet, durch ihre Fähigkeit erkannt, unphysiologische, chromogene Substrate, z.B. phenolische Sulfatester, zu spalten. Am häufigsten wird Nitrocatecholsulfat (2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat) als Substrat verwendet, daneben aber auch 4-Nitrophenylsulfat, 4-Acetylphenylsulfat, Phenylsulfat und Phenolphthaleindisulfat (38).



Nitrocatecholsulfat
(2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat)

Die Hydrolyse der Arylsulfatanionen erfolgt durch Spaltung der O-S-Bindung (128) nach der Gleichung



wobei R für den substituierten Phenolrest steht.

Auf Grund des Einflusses von Sulfationen, einem der Hydrolyseprodukte, auf die enzymatische Reaktion, lassen sich zwei Haupttypen von Arylsulfatasen unterscheiden, Typ 1 und 2. Der Typ 1 dieser Enzyme wird nur geringfügig oder überhaupt nicht durch Sulfat inhibiert, der Typ 2, dem die in dieser Arbeit näher untersuchten Sulfatasen angehören, wird stark inhibiert.

Arylsulfatasen des Typs 1 werden sowohl in Mikroorganismen als auch in Tieren gefunden. In Mikroorganismen wird die Synthese dieser Enzyme durch Sulfat, Sulfit und andere schwefelhaltige Verbindungen reprimiert (62). Die Natur des Repressors und die Funktion der Sulfatasen dieser Organismen sind noch unbekannt. Der Typ 1 der Arylsulfatasen der Wirbel-

tiere (Arylsulfatase C) scheint, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, physiologisch als Östrogensulfatase zu wirken (41). Diese Sulfatase ist in den Mikrosomen lokalisiert und fest an das Membransystem gebunden (91).

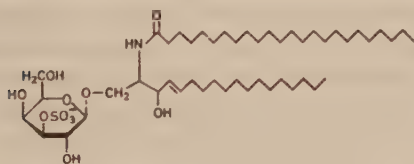
Das Vorkommen des Typs 2 der Arylsulfatasen scheint hauptsächlich auf das Tierreich beschränkt zu sein. Nur in einem einzigen Falle konnte bisher eine solche Sulfatase in Mikroorganismen, nämlich *Proteus vulgaris*, nachgewiesen werden (40). In Wirbeltieren werden zwei Typ 2 Arylsulfatasen beobachtet, eine saure (Arylsulfatase A) und eine basische (Arylsulfatase B), physikalisch unterschieden auf Grund ihres isoelektrischen Punktes. Im Kontext dieser Arbeit werden diese beiden Enzyme als saure und basische Form der Sulfatase bezeichnet. Die Arylsulfatasen des Typs 2 sind bei Säugetieren intrazellulär in den Lysosomen lokalisiert (37, 113) und leicht in Lösung zu bringen.

Das physiologische Substrat der Arylsulfatase B (basische Form) ist bis jetzt unbekannt. In jüngster Zeit ist die Vermutung geäußert worden, daß dieses Enzym am Mucopolysaccharidstoffwechsel beteiligt sein könnte, da bei Patienten mit einem Maroteaux-Lamy Syndrom, einer Chondroitinsulfat B-Stoffwechselstörung, ein Ausfall der Arylsulfatase B festgestellt wurde (133).

Die physiologische Funktion der Arylsulfatase A (saure Form) der Vertebraten konnte unter anderem durch Untersuchungen geklärt werden, die an Geweben von Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie durchgeführt wurden. Diese seltene, kongenitale Stoffwechselstörung ist chemisch gekennzeichnet durch die Speicherung von Cerebrosidsulfat vorwiegend in der weißen Substanz, dem Myelin, des Gehirns und in den Nieren, aber auch in anderen visceralen Organen (71, 72), enzymatisch durch den Ausfall der Arylsulfatase A-Aktivität (5). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß Cerebrosidsulfat das physiologische Substrat der Arylsulfatase A (saure Form) des Menschen darstellt, mit anderen Worten, die Arylsulfatase A eine Cerebrosidsulfatase ist. Eine weitere Bestätigung erfuhr diese Vermutung durch die Feststellung von Mehl und Jatzkewitz (89, 90), daß Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie auch einen Ausfall der Cerebrosidsulfatase aufwiesen. Durch weitere eingehende enzymkinetische Untersuchungen an gereinigten bzw. homogenen Arylsulfatasen A verschiedener Species (75, 130) konnte für die Enzyme aus Vertebraten eine Identität von Arylsulfatase A und Cerebrosidsulfatase gesichert werden.

Die Arylsulfatasen des Typs 2 der Avertebraten, obwohl in dieser Tiergruppe weit verbreitet, sind noch nicht eingehender untersucht worden, über eine Cerebrosidsulfatase ist bislang praktisch nichts bekannt. Lediglich Fujino und Negishi (48) berichteten von einem Enzym, das sie aus der Mitteldarmdrüse ("Leber") einer Muschel (*Haliotis spec.*) extrahiert hatten und das eine geringe Cerebrosidsulfatase-Aktivität aufwies, während sie bei einer Reihe anderer Species keine Aktivität nachweisen konnten. Die Eigenschaften dieses Enzyms wurden nicht weiter untersucht. Mehl und Jatzkewitz dagegen mißlang es, mit einem Arylsulfatasepräparat aus dem Gewebe einer Napfschnecke (*Patella vulgata*) Cerebrosidsulfat zu spalten (90).

Cerebrosidsulfat ist ein Glykosphingolipid (132), das amphiphile Eigenschaften besitzt (123). Der hydrophobe Anteil des Moleküls besteht aus dem langkettigen, aliphatischen Aminoalkohol Sphingosin (D-Erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-4,5-transoctadecen), der über die Aminogruppe mit einer langkettigen, aliphatischen Fettsäure amidartig verknüpft ist. Dieser Teil des Moleküls wird Ceramid (N-Acylsphingosin) genannt. Der hydrophile Anteil besteht aus Galactose und Sulfat. Erstere ist β -glycosidisch über das Kohlenstoffatom 1 mit der primären Hydroxylgruppe des Aminoalkohols verbunden. Die Sulfatgruppe schließlich ist esterartig mit dem Kohlenstoffatom 3 der Galactose verknüpft (152, 131, 132).



Cerebrosidsulfat
($\text{O}_3\text{S} \rightarrow 3 \text{ Gal } 1 \beta \rightarrow 1 \text{ Cer}$)

Cerebrosidsulfat findet sich in allen untersuchten Organen der Vertebraten, wie durch in vivo Untersuchungen mit radioaktiven Vorstufen des Lipids an Rattengeweben gezeigt werden konnte (59), überwiegend jedoch im Gehirn (30, 6) und in den Nieren. Im Gehirn ist Cerebrosidsulfat ein struktureller Bestandteil der weißen Substanz, und zwar des Myelinmembransystems (25, 80); über die subzelluläre Verteilung dieses Lipids in den visceralen Organen ist nichts bekannt. Während das Cerebrosidsulfat-Turnover in letzteren hoch ist, erweist sich das Lipid im Myelin des Gehirns des adulten Tieres als metabolisch stabil, wie durch Einbaustudien mit [^{35}S]Sulfat an Rattenorganen nachgewiesen werden konnte (59, 29).

Der Gehalt an Cerebrosidsulfat pro Gewichtseinheit der visceralen Organe, speziell der Niere, bleibt während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie der Ratte weitgehend konstant, im Gehirn dagegen sind bis zum Beginn der Myelinisierung nur Spuren dieses Lipids nachzuweisen (76, 146, 66). Das Auftreten des Cerebrosidsulfats während der Entwicklung verläuft im Anschluß an die Proliferation der Oligodendrogliazellen parallel zur Differenzierung ihrer Plasmamembranen zu den Membranen des Myelins (140, 106).

Das Vorkommen von Cerebrosidsulfat bei Invertebraten ist bislang nicht gesichert (139); soweit das Nervensystem untersucht wurde, waren die Befunde widersprüchlich (67, 110, 79), was auf das Fehlen von echtem Myelin in dieser Tiergruppe (19, 18) zurückgeführt werden kann. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß dieses Lipid in anderen Strukturen als dem Myelin vorkommt und bei einem kleinen Pool ein verhältnismäßig hohes Turnover besitzt; dafür spräche das Auftreten von Sphingosin, Ceramid und Cerebrosid bei Avertebraten (55, 100, 99).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, unter dem Gesichtspunkt der vergleichenden Enzymbiologie die Arylsulfatasen einiger Avertebraten und eines Vertebraten näher zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere geprüft werden, inwieweit physikalisch-chemische Eigenschaften der Arylsulfatasen und die Eigenschaften der katalytischen Reaktion dieser Enzyme phylogenetische Zusammenhänge struktureller und funktioneller Art erkennen lassen. In funktioneller Hinsicht erschien es aufschlußreich, die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Arylsulfatasen der Avertebraten in An- und Abwesenheit von Aktivatoren zu prüfen und gegebenenfalls mit den Verhältnissen bei Vertebraten zu vergleichen, da das Lipidsubstrat, Cerebrosidsulfat, als Baustein des Myelins der Vertebraten Beziehungen zum Nervensystem aufweist, im Nervensystem der Avertebraten jedoch noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte.

Ferner sollte eine vergleichende Untersuchung der Aktivität und der intrazellulären Lokalisation der Arylsulfatase A (saure Form) zweier Säugerorgane während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie Aufschluß erbringen, ob diesem Enzym eine Funktion bei der Regulation der Membranosynthese durch die Oligodendrogliazelle bei der Bildung des Myelins zukommt.

2. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen Ergebnisse wurden durch Untersuchung der Sulfatasen von Vertretern folgender Tierstämme erhalten: Porifera (Schwämme), Cnidaria (Nesseltiere), Mollusca (Weichtiere), Annelida (Ringelwürmer), Arthropoda (Gliedertiere), Echinodermata (Stachelhäuter), Tunicata (Manteltiere) und Vertebrata (Wirbeltiere) (vgl. Abs. 4.1.).

2.1. Extraktion und Anreicherung der Sulfatasen

Die Sulfatasen zeigten bei Lagerung der Gewebe im tiefgefrorenen Zustand (-20°C) keinen Aktivitätsverlust. Sie ließen sich nach Desintegration der Zellen leicht mit Puffer extrahieren und mit Hilfe verschiedener Proteinfractionierungsmethoden reinigen und anreichern. Die Anreicherung der Sulfatasen lehnte sich an bereits beschriebene Methoden an (94, 14) und umfaßte folgende Schritte: Pufferextraktion, Fällungen mit Aceton und Ammoniumsulfat, isoelektrische Fokussierung, Gelchromatographie und Membranfiltration. In Tab. 1 ist der Aufarbeitungsgang am Beispiel von *Microcosmus sulcatus* (Tunicata) wiedergegeben.

Die Extraktion erfolgte mit Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,5), der 0,2 % (Vol./Vol.) Triton X-100, ein nichtionisches Detergenz, enthielt, aus 2, 10 oder 20 %-igen Gewebshomogenaten, wobei die Anwesenheit des Detergenz eine annähernd quantitative Extraktion der Enzyme ermöglichte (64).

Die Sulfatasen ließen sich bei pH 5,5 sowohl mit Aceton als auch mit Ammoniumsulfat ausfällen. Die zur Fällung notwendigen Konzentrationen variierten nur geringfügig von Art zu Art und wurden durch Vorversuche ermittelt. Bei etwa 50 - 60 % Acetonzusatz (Vol./Vol.) und etwa 55 - 65 % Ammoniumsulfat-Sättigung (Gew./Vol.) fand sich die höchste spezifische Aktivität im Präzipitat.

Die präparative Auftrennung der Sulfatasen in ihre multiplen Formen (Abs. 2.2.1.1.) wurde (in einer ersten Aufarbeitungsreihe; Abs. 4.9.) durch

Tab. 1 Anreicherung der Sulfatasen

Die Anreicherung der Sulfatasen ist am Beispiel von *Microcosmus sulcatus* (Tunicata) wiedergegeben. Die experimentellen Einzelheiten sind unter Abs. 4.9. beschrieben. Die Enzymaktivitäten wurden mit Nitrocatheolsulfat als Substrat bestimmt (Abs. 4.3.1.1.), die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (84) mit Rinderalbumin als Standard.

Aufarbeitungs- schritt	Volumen [ml]	Enzymaktivität [mU]	Protein [mg]	Spez. Akt. [mU/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung
(a) Homogenat ¹⁾	1000	46121	11785	3,9	100	1
(b) Rohrer Extrakt	1200	27131	10618	2,5	58,8	0,7
(c) Aceton-Fällung	100	19758	94	211	42,8	54
(d) Ammonium- sulfat-Fällung	22	15098	51	295	32,7	76
(e) Elektro- fokussierung ²⁾	-	-	-	-	-	-
(f) Gelchromato- graphie	I ³⁾ 152 II ³⁾ 122	13018 1476	17,5 11,2	744 132	28,2 3,2	213 377
(g) Membran- filtration	I 3,3 II 2,8	2845 525	2,0 0,8	1423 656	6,2 1,1	406 1875

¹⁾ Die Anreicherung erfolgte aus 200 g Gewebe.

²⁾ Die Elektrofokussierung wurde bei dieser Aufarbeitungsreihe nicht durchgeführt (vgl. Abs. 4.9.).

³⁾ I und II bezeichnen Enzymlfraktionen I bzw. II mit Molekulargewichten von 60-70000 bzw. 110-130000 (vgl. Abs. 2.2.1.2.). Die Aktivitäten beider Enzymlfraktionen verhalten sich etwa wie 10:1.

isoelektrische Fokussierung erreicht. Abb. 1 gibt einige so erhaltene Enzymmuster wieder. Es zeigte sich, daß teilangereicherte Enzympräparate nur unter erheblichen Verlusten an Enzymaktivität elektrofokussiert werden konnten, wogegen nach Fokussierung roher Extrakte keine Verluste festgestellt wurden (Abs. 4.5. und (93)).

Die präparative Auftrennung der Sulfatasen auf Grund ihrer Molekulargewichte erfolgte (in einer zweiten Aufarbeitungsreihe; Abs. 4.9.) durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 bei pH 5,5 (0,2 M Natrium-Puffer). In Abb. 2 sind die Ergebnisse einiger präparativer Trennungen dargestellt.

Die gesamte Aufarbeitung wurde in Anwesenheit von Triton X-100 durchgeführt, da dieses Detergenz einen stabilisierenden Einfluß auf die Sulfatasen ausübt (L.M. Dzaloszynski, persönliche Mitteilung). Konzentrierung der Enzymlösungen und gleichzeitige Entfernung des freien Triton X-100 wurde durch Membranfiltration erreicht.

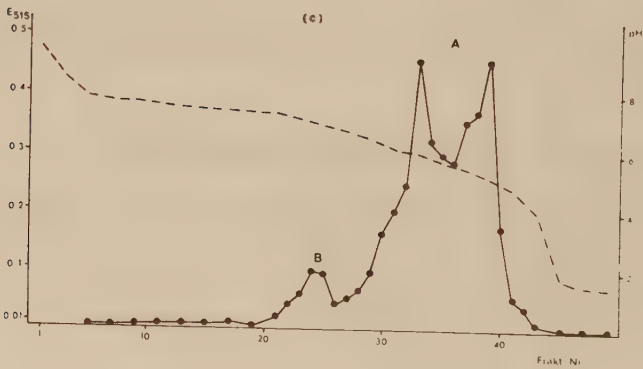
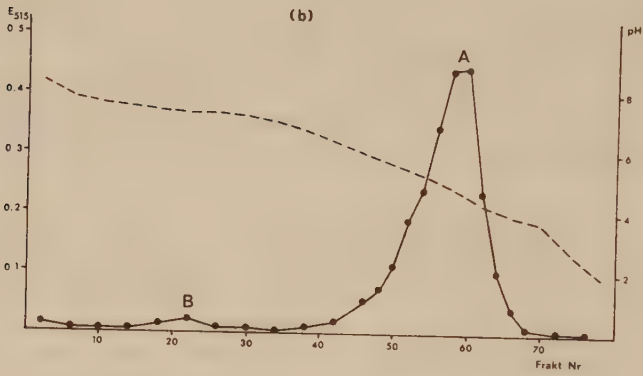
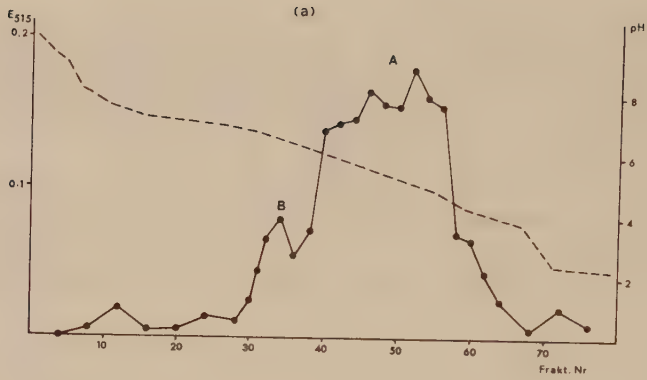
Die spezifischen Aktivitäten der erhaltenen Enzympräparate gegenüber Nitrocatecholsulfat als Substrat lagen zwischen 0,1 und 10 U/mg Protein bei einem Anreicherungsfaktor von 50 bis 1000 und einer Ausbeute von 5 bis 20 %.

Die angereicherten Enzympräparate waren nicht frei von Fremdproteinen, wie sich mit Hilfe von Disk-Elektrophorese an 7,5 %-igem Trenngel bei pH 7,5 zeigen ließ. Enzymatisch ließen sich in unterschiedlicher Menge noch andere saure Hydrolasen, z.B. saure Phosphatase, β -N-Acetylglucosaminidase und Galactosylceramid- β -D-galactosidase (vgl. Abs. 2.2.2.), nachweisen. Die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe dagegen war frei von basischer Form und Galactosylceramid- β -D-galactosidase.

Die angereicherten Sulfatasen, insbesondere die basischen Formen, zeigten sowohl bei +2°C als auch bei -20°C Aktivitätsverluste bei längerer Lagerung.

2.2. Eigenschaften der Sulfatasen verschiedener Species

Die Art der Enzympräparate, die für die unten beschriebenen Untersuchungen verwendet wurden, ist in Abs. 4.9. näher charakterisiert. Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden nur die sauren Formen der Sulfatasen näher untersucht.



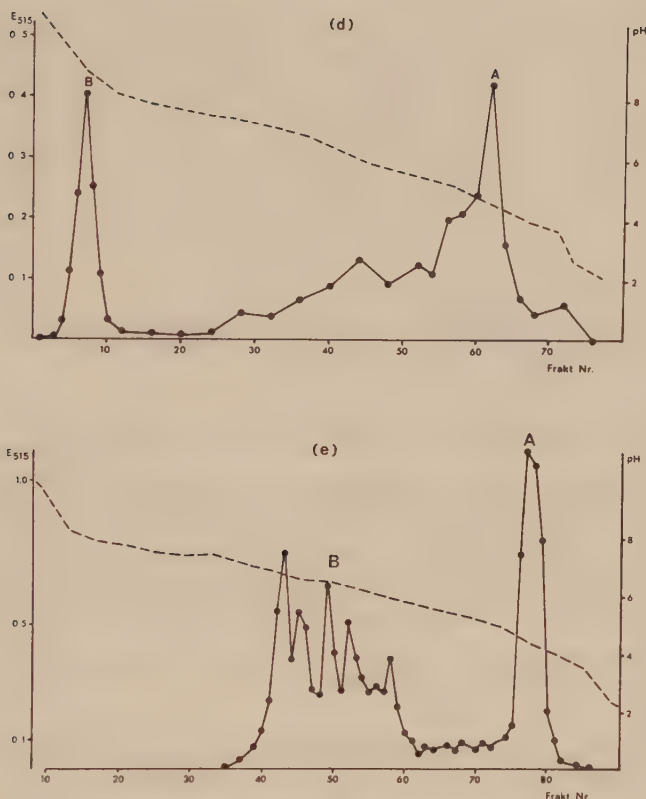
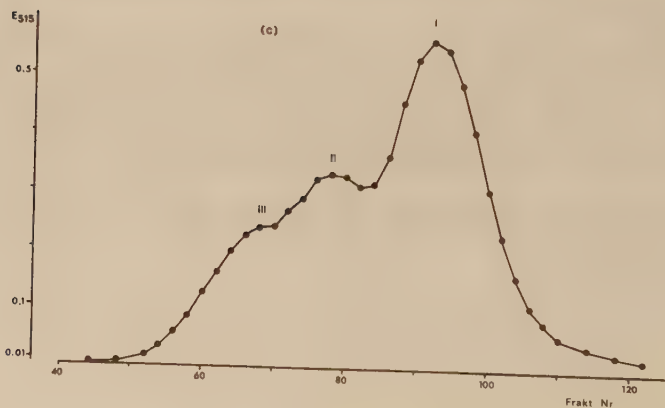
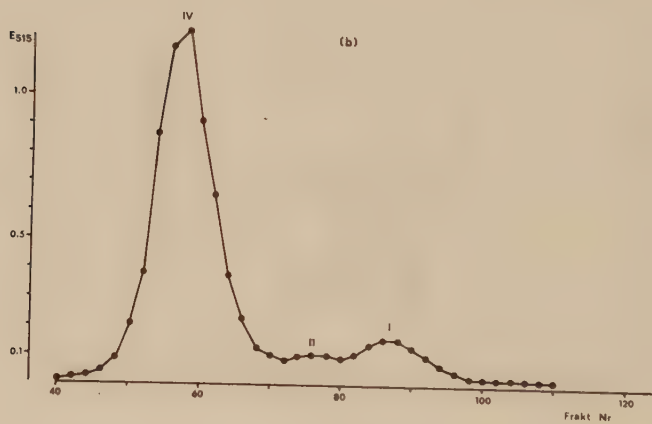
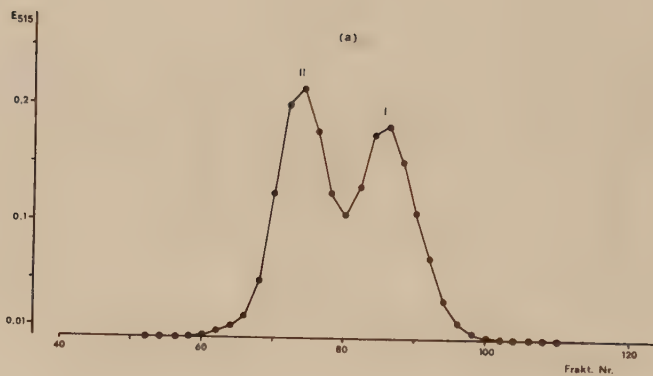


Abb. 1 Speciesabhängige Variation der multiplen Formen der Arylsulfatase

Die präparative Auftrennung der Enzymformen erfolgte durch isoelektrische Fokussierung wie in Material und Methoden (Abs. 4.5.) beschrieben. Der linke Hauptgipfel (B) stellt die basische, der rechte (A) die saure Form der Arylsulfatase dar. Die Enzymaktivität (●—●) wurde mit Nitrocatecholsulfat als Substrat bestimmt und ist als Extinktion des freigesetzten Nitrocatechols bei 515 nm angegeben. Der pH-Wert (---) der Fraktionen wurde bei +20°C gemessen.

- (a) *Tethya aurantium* (Porifera); (b) *Patella vulgata* (Mollusca);
 (c) *Lima inflata* (Mollusca); (d) *Microcosmus sulcatus* (Tunicata);
 (e) Ratte (Vertebrata).



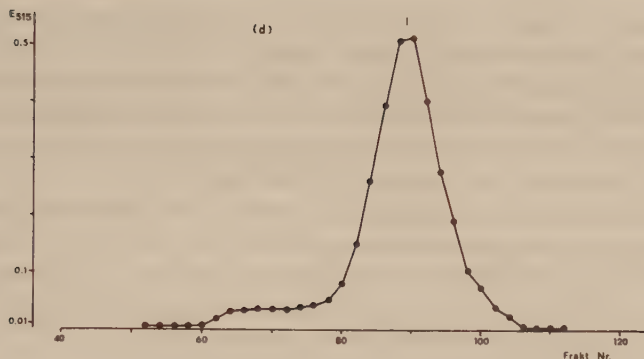


Abb. 2 Speciesabhängige Variation der oligomeren Formen der Arylsulfatase

Die präparative Auftrennung der Enzymformen erfolgte durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 mit Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,0; 0,1 % an Triton X-100) als Elutionsmittel. Die Enzymaktivität, mit Nitrocatecholsulfat als Substrat bestimmt, ist angegeben als Extinktion des freigesetzten Nitrocatecholats bei 515 nm. I, II, III und IV bezeichnen Enzymfraktionen, denen ein Molekulargewicht von 60-70, 110-130, 220-240 bzw. $>400 \cdot 10^3$ zukommt (Abs. 2.2.1.2.).

(a) *Patella vulgata* (Mollusca); (b) *Blaberus spec.* (Arthropoda); (c) *Maja squinado* (Arthropoda); *Microcosmus sulcatus* (Tunicata).

2.2.1. Physikalische und chemische Eigenschaften der Sulfatasen

2.2.1.1. Multiple Formen der Sulfatasen. Isoelektrische Punkte

Das Auftreten einer Multiplizität der Sulfatasen wurde mittels isoelektrischer Fokussierung im pH-Bereich 3,5 bis 8,0 bei einer Trägerampholytkonzentration von 1-2 % (Gew./Vol.) geprüft. Untersucht wurden rohe Enzympräparate, Pufferextrakte und Präzipitate nach Aceton-Fällung, um Artefakte, die durch die Anreicherung der Enzyme bedingt sind (148), weitgehend auszuschließen. Andererseits jedoch sind Kunstprodukte, wie sie z.B. durch Adduktbildung auf Grund hydrophober Wechselwirkung oder lokale Störung des pH-Gradienten durch Fremdstoffen hervorgerufen werden, durch dieses Vorgehen nicht auszuschließen.

Abb. 1 zeigt an einigen Beispielen die Ergebnisse präparativer Elektrofokussierungen nach der Methode von Vesterberg und Svensson (141). Entsprechende Enzymmuster wurden erhalten, wenn die Fokussierung im analytischen Maßstab nach Harzer (63) bei geringer Beladung der Trenn-

säulen durchgeführt wurde. Mit Ausnahme der Enzyme der Gastropoden *Patella vulgata* und *Helix pomatia* (39) ließen sich die Sulfatasen der untersuchten Species unter den angegebenen Bedingungen grundsätzlich wenigstens in zwei mehr oder weniger klar getrennte Fraktionen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten bzw. Bereichen auftrennen, woraus auf das Vorkommen von multiplen Formen geschlossen werden kann. Die erhaltenen Enzymmuster verschiedener Species unterschieden sich sowohl in Bezug auf die isoelektrischen Punkte der Sulfatasen als auch in Bezug auf das Verhältnis der beiden Formen, was auch für andere Hydrolasen, z.B. für die β -N-Acetylglucosaminidase, unterschiedlicher Herkunft mit der gleichen Methode gezeigt werden konnte (118).

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, lagen die isoelektrischen Punkte der sauren Formen der Sulfatasen im pH-Bereich von 4,5 - 5,5, die der basischen Formen im pH-Bereich von 6,3 - 7,5, sieht man von wenigen Ausnahmen ab. Die isoelektrischen Punkte lassen also für die jeweilige Enzymform nur geringe Speciesunterschiede erkennen und erscheinen somit als ein konservatives Merkmal des Enzymmoleküls.

Dagegen wies das Verhältnis der beiden Formen der Sulfatase eine größere Variabilität auf, obwohl der Anteil der basischen Form der Sulfatase an der Gesamtaktivität im allgemeinen gering war. So konnte dieser z.B. bei *Patella vulgata* und *Helix pomatia* (Abb. 1b) nur in Spuren nachgewiesen werden, bei *Tethya aurantium* (Abb. 1a), *Maja squinado* und *Holothuria forsk.* betrug er nur etwa 5-20 %, stellte jedoch bei *Microcosmus sulcatus* und der Ratte (Gehirn) (Abb. 1e) etwa 40 bzw. 60 % der Gesamtaktivität dar. Im Vergleich zu rohen Sulfatasepräparaten ließ die isoelektrische Fokussierung angereicherter Präparate ein qualitativ gleichartiges Enzymmuster erkennen, jedoch schien das Verhältnis von saurer und basischer Form zugunsten der sauren Form verschoben.

Einige Sulfatasefraktionen erwiesen sich nach Elektrofokussierung als einheitlich, z.B. die sauren Formen von *Patella vulgata*, *Helix pomatia*, *Lumbricus terrestris* und der Ratte und die basische Form von *Microcosmus sulcatus*, andere Fraktionen dagegen ließen eine stark ausgeprägte (Mikro)-Heterogenität erkennen, z.B. die sauren Formen von *Pecten jacobaeus* und *Microcosmus sulcatus* und die basischen Formen von *Lumbricus terrestris* und der Ratte (Abb. 1). Diese (Mikro)-Heterogenität stellte sich nach Refokussierung der Enzymfraktionen wieder dar und konnte auch nach Anreicherung der Sulfatasen (nach Aufarbeitungsschritt (g), vgl. Abs. 4.9.), soweit untersucht, nachgewiesen werden.

Tab. 2 Isoelektrische Punkte der multiplen Formen der Arylsulfatase verschiedener Invertebraten und der Ratte

Die isoelektrischen Punkte der Enzyme wurden mittels Elektrofokussierung nach der Methode von Vesterberg und Svensson (141) bestimmt. Die experimentellen Einzelheiten sind in Abs. 4.5. dargestellt. Die angegebenen pH-Werte bezeichnen das Maximum des Enzympeaks und stellen Mittelwerte aus wenigstens fünf Bestimmungen dar.

Tierart	Isoelektrische Punkte der multiplen Formen der Arylsulfatasen	
	[pH]	
	Basische Form	Saure Form
<i>Tethya aurantium</i>	6,7	5,3
<i>Actinia equina</i>	6,7	5,4 und 4,6 ²⁾
<i>Patella vulgata</i>	7,4 ¹⁾	4,5
<i>Helix pomatia</i>	7,5 ¹⁾	4,6
<i>Lima inflata</i>	7,2	5,1 und 6,0 ²⁾
<i>Pecten jacobaeus</i>	7,20	5,0 und 6,1 ²⁾
<i>Lumbricus terrestris</i>	6,70(heterogen)	3,8
<i>Maja squinado</i>	6,2 und 7,1 ¹⁾	4,8
<i>Blaberus spec.</i>	5,5	4,6
<i>Holothuria forskäli</i>	6,3	4,5
<i>Marthasterias glacialis</i>	6,9	5,0
<i>Microcosmus sulcatus</i>	8,9	4,8(heterogen)
Ratte	6,6(heterogen)	4,45

1) In dem mit der isoelektrischen Fokussierung erfaßbaren pH-Bereich konnten nur Spuren der basischen Form nachgewiesen werden.

2) Die saure Form weist nach analytischer Elektrofokussierung zwei getrennte Peaks auf.

Eine Klärung der Natur der Heterogenität der Enzymformen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Hinweise auf Organunterschiede der multiplen Formen der Sulfatase erbrachte die vergleichende Untersuchung des Gehirns und der Niere der Ratte. Dabei konnte gezeigt werden, daß nur das quantitative Verhältnis der beiden Formen der Sulfatase Unterschiede aufwies. Im Gehirn betrug der Anteil der sauren Form etwa 35-40 %, in der Niere etwa 15-20 % der Gesamtsulfataseaktivität. Hinsichtlich der Anzahl der Enzymfraktionen,

ihrer isoelektrischen Punkte und ihrer (Mikro)-Heterogenität wurden keine Unterschiede festgestellt. Analoge Beobachtungen wurden für β -N-Acetylglucosaminidase menschlicher Gewebe gemacht (65). Da aus praktischen Gründen die Sulfatasen der Wirbellosen aus dem Gesamtorganismus der Tiere extrahiert wurden, lassen sich Organunterschiede nur vermuten.

Subzelluläre Fraktionierung des Gehirngewebes der Ratte nach der von Koenig et al. (77) angegebenen Methode ließ erkennen, daß beide Formen der Sulfatase im Dichtegradienten gemeinsam sedimentieren und hauptsächlich in einer Fraktion gefunden wurden, die Lysosomen angereichert enthielt (vgl. Abs. 2.3.1.). Auftrennung der Sulfatasen dieser Fraktion in ihre multiplen Formen mittels Elektrofokussierung ergab ein Enzymmuster, wie es für das Gesamtgehirn charakteristisch ist.

2.2.1.2. Monomer- und Oligomerformen der Sulfatasen. Molekulargewichte

Die scheinbaren Molekulargewichte der Sulfatasen wurden mit Hilfe der Gelchromatographie an Sephadex G-200 nach der Methode von Andrews (3, 4) in zwei verschiedenen Puffersystemen (0,05 M Tris/Salzsäure-Puffer, pH 7,5 und 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0) in Anwesenheit von Triton X-100 (0,1 %, Vol./Vol.) bestimmt.

Allgemein zeigte sich, wie durch Abb. 2, in der einige Beispiele präparativer Chromatographien zusammengestellt sind, illustriert, daß für die scheinbaren Molekulargewichte der mit I bis IV bezeichneten Sulfatasefraktionen (nach Aufarbeitungsschritt (g), vgl. Abs. 4.9.) unabhängig vom verwendeten Puffersystem sowie unabhängig von der untersuchten Tierart Werte von 60 - 70000 (Fraktion I) und Vielfache davon, nämlich 110 - 130000 (II), 220 - 240000 (III) und >400000 (IV), erhalten wurden. Dabei konnte, abgesehen von zwei Ausnahmen, *Helix pomatia* und Ratte, bei allen untersuchten Tieren eine Sulfatasefraktion mit dem Molekulargewicht 60 - 70000 (Fraktion I) nachgewiesen werden. Daneben traten in unterschiedlichem Ausmaß die Sulfatasefraktionen II bis IV auf. In Tab. 3 sind die Ergebnisse für die untersuchten Tierarten im einzelnen zusammengestellt.

Die untersuchten Enzyme ließen sich hinsichtlich der Reaktion auf unterschiedliche Chromatographiebedingungen bei der Molekulargewichtsbestimmung, pH-Wert und Ionenstärke des Puffers und Enzym(Protein)-Konzentration der Probe, in drei Gruppen einteilen.

Eine Gruppe von Sulfatasen (Tab. 3a) ließ keine Reaktion auf die Änderung eines der genannten Parameter erkennen: Chromatographien bei verschiedenen pH-Werten wie bei verschiedenen Pufferkonzentrationen erbrachten keinen Hinweis auf eine Änderung des scheinbaren Molekulargewichtes. Über die prozentuale Verteilung der Enzymfraktionen I und II, Fraktion III und IV wurden hier nicht gefunden, nach präparativer Gelchromatographie gibt Tab. 3a Auskunft.

Bei einer zweiten Gruppe von Sulfatasen (Tab. 3b) scheint eine niedrige Enzym(Protein)-Konzentration während der Gelfiltration für eine Monomerisierung oligomerer Formen verantwortlich zu sein. Nach Chromatographie der Sulfatasefraktionen III und II (*Maja squinado*) bzw. IV und II (*Holothuria forskali*) in 0,05 wie in 0,2 M Puffer konnte das Auftreten niedermolekularer Enzymfraktionen (I, II und III) neben den jeweiligen Ausgangsfraktionen gezeigt werden; die Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen im Elutionspuffer (1 M Natriumchlorid) verhinderte dagegen, soweit geprüft, eine derartige Aufspaltung in niedermolekulare Enzymformen, bewirkte aber umgekehrt keine nachweisbare Oligomerisierung der monomeren Formen. Ein Einfluß des pH-Wertes konnte nicht festgestellt werden.

Die dritte Gruppe umfaßt Sulfatasen (Tab. 3c), die in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert des Elutionspuffers ein unterschiedliches Elutionsverhalten und entsprechend ein unterschiedliches scheinbares Molekulargewicht aufwiesen, in Analogie zu den Befunden, die Nichol und Roy (94, 95) an hochgereinigter Sulfatase aus Rinderleber mittels Ultrazentrifugation erhoben haben. Im einzelnen wurden folgende Beobachtungen gemacht. Die Sulfatase von *Actinia equina* wurde nach Chromatographie bei pH 7,5 als eine Enzymfraktion mit einem Molekulargewicht von 60 - 70000 (I), nach Chromatographie bei pH 5,0 als drei diskrete Enzymfraktionen mit Molekulargewichten von 60 - 70000, 110 - 130000 und 220 - 240000 (I, II, III) eluiert, während die Sulfatase von *Blaberus spec.* bei pH 7,5 ein scheinbares Molekulargewicht von 220 - 240000 (III), bei pH 5,0 ein scheinbares Molekulargewicht von >400000 (IV) aufwies, jeweils neben geringen Anteilen mit Molekulargewichten von 60 - 70000 (I) und 110 - 130000 (II). Die saure Form der Sulfatase der Ratte schließlich scheint bei pH 7,5 hauptsächlich mit einem Molekulargewicht von 110 - 130000 (II), bei pH 5,0 mit einem Molekulargewicht von >400000 (IV) vorzuliegen, in Übereinstimmung mit den Experimenten von Worwood et al. (151). Darüberhinaus ließen sich, wie im Falle von *Blaberus*, auch kleinere Anteile

Tab. 3 Scheinbare Molekulargewichte der Sulfatasen verschiedener Avertebraten und der Ratte

Die scheinbaren Molekulargewichte der Sulfatasen wurden nach der Methode von Andrews (3, 4) mittels Gelchromatographie an Sephadex G-200 in zwei verschiedenen Puffersystemen (0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0 und 0,05 M Tris/Salzsäure-Puffer, pH 7,5) in Anwesenheit von Triton X-100 (0,1 %, Vol./Vol.) bestimmt. Die experimentellen Einzelheiten sind unter Abs. 4.6. beschrieben. Die Sulfatase-Aktivitäten wurden mit Nitrocathecholsulfat als Substrat gemessen (Abs. 4.3.1.1.).

	Tierart	Untersuchte Enzymfraktion ¹⁾	Prozentuale Verteilung ²⁾	Scheinbares Molekulargewicht ($\times 10^{-3}$)			
				60-70	110-130	220-240	>400
(a)	<i>Tethya aurantium</i>			● ³⁾			
	<i>Lima inflata</i>	I	90	■ ³⁾	-	-	-
	<i>Pecten jacobaeus</i>						
	<i>Lumbricus terrestris</i>	II	10	-	●	-	-
	<i>Marthasterias glacialis</i>						
	<i>Microcosmus sulcatus</i>						
	<i>Patella vulgata</i>	I	50	●	■	-	-
		II	50	-	●	-	-
	<i>Helix pomatia</i>	II	100	-	●	-	-
(b)	<i>Maja squinado</i>	I	50	●	-	-	-
		II	30	○	●	-	-
		III	20	○	○	●	-

Holothuria forsk.

I	10	■	-	-
II	45	□	■	-
IV	45	□	□	● ■

(c)	<i>Actinia equina</i>	I+II+III	20, 40, 40	● ■	● □	● □	-
	<i>Blaberus spec.</i>	I+II+IV	15, 5, 85	□	□	□ ■	●
	Ratte (saure Form der Sulfatase)	II+IV	20, 80	□	□ ■	○	●

1) I, II, III und IV bezeichnen Enzymfraktionen, die nach präparativer Gelchromatographie an Sephadex G-200 mit 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0, als Elutionsmittel in Anwesenheit von 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100 erhalten wurden. Die Sulfatasen der unter (c) zusammengestellten Tiere wurden ohne vorausgehende Trennung untersucht.

2) Die prozentuale Verteilung gibt (in Schätzwerten) das Verhältnis der nach präparativer Gelchromatographie erhaltenen Enzymfraktionen I - IV an.

3) Verwendete Puffersysteme: ● bzw. ○ 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0, ■ bzw. □ 0,05 M Tris/Salzsäure-Puffer, pH 7,5. Mit den geschlossenen Symbolen werden die Hauptfraktionen bezeichnet, mit den offenen Symbolen die Fraktionen, die mit weniger als etwa 20 % zur Gesamtkativität beitragen.

der Formen mit jeweils niedrigeren Molekulargewichten nachweisen, was außer einer pH-Abhängigkeit auch eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration vermuten läßt. Diese Vermutung wurde bestärkt durch die Ergebnisse von Chromatographien bei pH 7,5 mit unterschiedlicher Enzym-(Protein)-Konzentration, die darauf hindeuten, daß das Enzym mit einem Molekulargewicht von 110-130000 (II) weiter in enzymatisch aktive Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 60-70000 (I) gespalten wurde.

Die basische Form der Sulfatase der Ratte besaß ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 55000 und ließ keine Besonderheiten erkennen.

Für die Oligomerisierung bzw. Monomerisierung der Sulfatasen der hier untersuchten Species ließen sich qualitativ die gleichen Bedingungen wahrscheinlich machen, wie sie für die Sulfatase (saure Form) aus Rinderleber gefunden wurden (96, 114): Niedriger pH-Wert, hohe Ionenstärke sowie hohe Enzym(Protein)-Konzentration begünstigen die Bildung von Oligomerformen, hoher pH-Wert, niedrige Ionenstärke sowie niedrige Enzym(Protein)-Konzentration dagegen begünstigen die Aufspaltung in die Monomerform.

Demnach bedeutet die teilweise Trennung zweier oder mehrerer Enzymfraktionen, die ineinander übergeführt werden können (vgl. Abb. 2 b und c), nicht, daß eine tatsächliche Auftrennung erzielt wurde (150). In jeder Fraktion wird sich entsprechend den gegebenen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen der Monomer- und den verschiedenen Oligomerformen einstellen.

Die Kinetik dieses Umwandlungsvorgangs und der Einfluß verschiedener Parameter auf diese muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

2.2.1.3. Thermostabilität der Sulfatasen

Die Prüfung der Thermostabilität der Sulfatasen wurde in ungepufferter, wäßriger Lösung vorgenommen. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wiesen die Sulfatasen aller untersuchten Tierspecies eine annähernd gleiche thermische Labilität auf; die Enzyme waren bis etwa 45°C stabil und verloren zwischen 45 und 60°C etwa 80 % ihrer Aktivität. Entsprechende Unterschiede der thermischen Stabilität, wie sie Gatt (52) für die β -Galactosidase poikilothermer und homoiothermer Tiere fand, konnten für die Sulfatasen der hier untersuchten Tiere unter den verwendeten Bedingungen nicht erkannt werden. Das Inaktivierungsprofil der Sulfa-

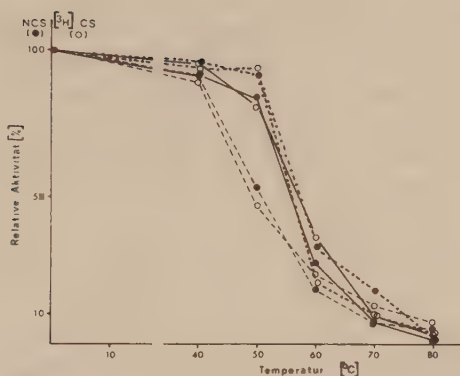


Abb. 3 Hitzeinaktivierung der Sulfatasen (saure Form)

Die Enzyme wurden 30 Min. (in ungepufferter Lösung) bei den in der Abb. angegebenen Temperaturen vorinkubiert. Anschließend wurden ihre Aktivitäten bei 37°C gegenüber den Substraten Nitrocatecholsulfat (●) und Cerebrosidsulfat (○) bestimmt.

— Actinia equina (Cnidaria); --- Lima inflata (Mollusca); -.-.- Ratte (Vertebrata).

tasen einer Species stimmte für beide Substrate, Nitrocatecholsulfat und Cerebrosidsulfat, überein.

2.2.1.4. Glykoproteinnatur der Sulfatasen

Die Glykoproteinnatur der Sulfatasen konnte mit Hilfe von Concanavalin A nachgewiesen werden. Concanavalin A ist ein Lektin (Phytohämagglutinin) aus *Canavalia ensiformis*, das sich wie ein spezifischer Antikörper gegen Polysaccharidantigene verhält (56) und entsprechend einer Antigen-Antikörper-Reaktion auch mit Glykoproteinen Komplexe bildet (22). Die Reaktion zwischen Concanavalin A und Kohlenhydrate enthaltenden Verbindungen ist spezifisch für α -D-Glykosyl- und sterisch verwandte Reste (56) und wird inhibiert z.B. durch Methyl- α -D-glucopyranosid (105). In Lösung bei einem pH-Wert von 5,0 liegt Concanavalin A als Dimeres mit einem Molekulargewicht von 55000 vor (102, 85).

Obwohl die Reaktion von Concanavalin A mit den Sulfatasen zu keinem zentrifugierbaren Präzipitat führte, vermutlich auf Grund der nicht optimalen Proportionen der Reaktionspartner, konnte eine Komplexbildung zwischen beiden durch eine Erhöhung des scheinbaren Molekulargewichts der

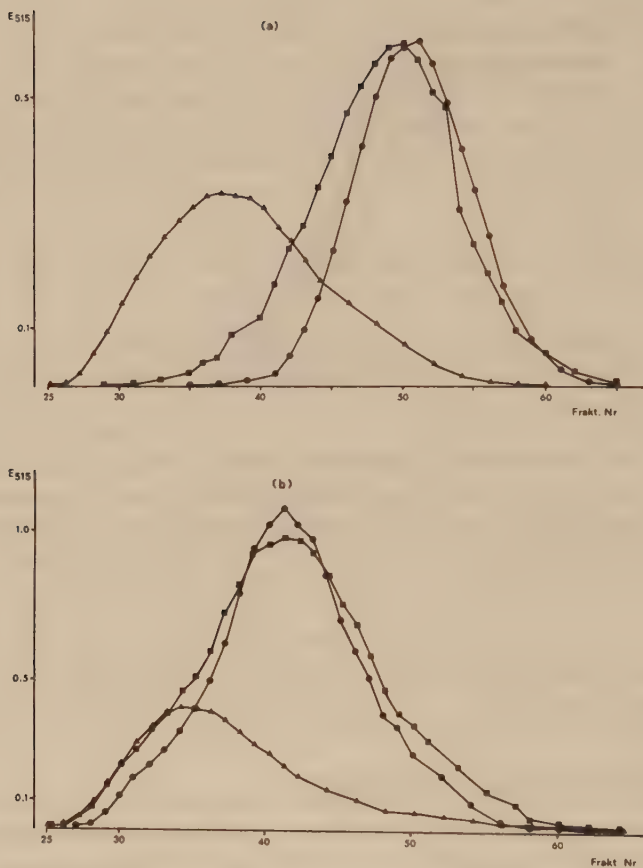


Abb. 4 Nachweis der Glykoproteinnatur der Sulfatasen durch Kochchromatographie der Enzyme mit Concanavalin A

Die Gelchromatographie der Sulfatasen an Biogel P-200 erfolgte in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (▲) von Concanavalin A. Als Kontrolle wurde eine Chromatographie in Anwesenheit von Concanavalin A unter Zusatz von Methyl- α -D-glucopyranosid (■) durchgeführt. Elutionspuffer: 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0, 1,0 M an Natriumchlorid und 1,0 mM an Magnesium-, Calcium- und Manganchlorid. Die Aktivität der Sulfatase wurde mit Nitrocatecholsulfat als Substrat bestimmt und ist als Extinktion des freigesetzten Nitrocatecholats bei 515 nm angegeben.

(a) *Patella vulgata*, Enzymfraktion I (MG 60-70 · 10³); (b) *Patella vulgata*, Enzymfraktion II (MG 110-130 · 10³).

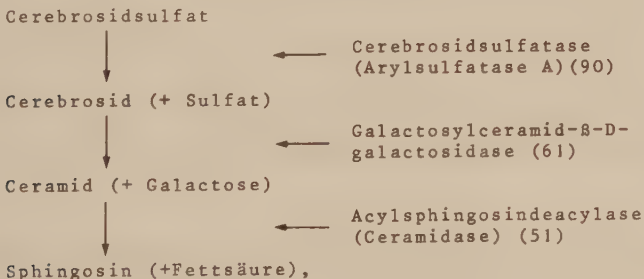
Sulfatasen nach Kochchromatographie an Biogel P-200 nachgewiesen werden, wie aus Abb. 4 hervorgeht. Die Abhängigkeit dieser Komplexbildung vom Kohlenhydratanteil der Enzyme kann durch Zusatz von Methyl- α -D-glucopyranosid zum Elutionspuffer gezeigt werden: Die Bildung des Sulfatase-Concanavalin A-Komplexes ist dadurch inhibiert und das Elutionsvolumen der Sulfatase ist dann wieder praktisch identisch mit dem von Sulfatase ohne Concanavalin A-Zusatz.

Alle untersuchten Sulfatasen der Wirbellosen, die monomeren wie die oligomeren Formen (Abs. 2.2.1.2.), erwiesen sich als Glykoproteine in Übereinstimmung mit den Befunden, die an Sulfatasen von Wirbeltieren erhoben wurden (2, 12, 58). Über die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils lassen sich mit Hilfe der hier verwendeten Methode keine Aussagen machen, außer daß das Vorhandensein von Glucose und/oder Mannose als Bestandteil angenommen werden kann.

Aus Analogiegründen darf jedoch auch das Vorkommen von Aminosukcern und Neuraminsäure, wie für andere Glykoproteine beschrieben (57), vermutet werden. Eine Variabilität dieser Komponenten bei gleichbleibendem Proteingrundgerüst könnte dann als Ursache angesehen werden für die in Abs. 2.2.1.1. beschriebene Mikroheterogenität des isoelektrischen Verhaltens einiger Sulfatasefraktionen, möglicherweise sogar für das Auftreten multipler Formen.

2.2.2. Substratspezifitäten der Sulfatasen

Der Abbau des Glykolipids Cerebrosidsulfat durch rohe Enzympräparate verläuft bei Vertebraten nach dem Schema



katalysiert durch die angegebenen lysosomalen (145) sauren Hydrolasen. Bei reinen Sulfatasepräparaten bleibt der Abbau auf der Stufe des Cerebrosids stehen.

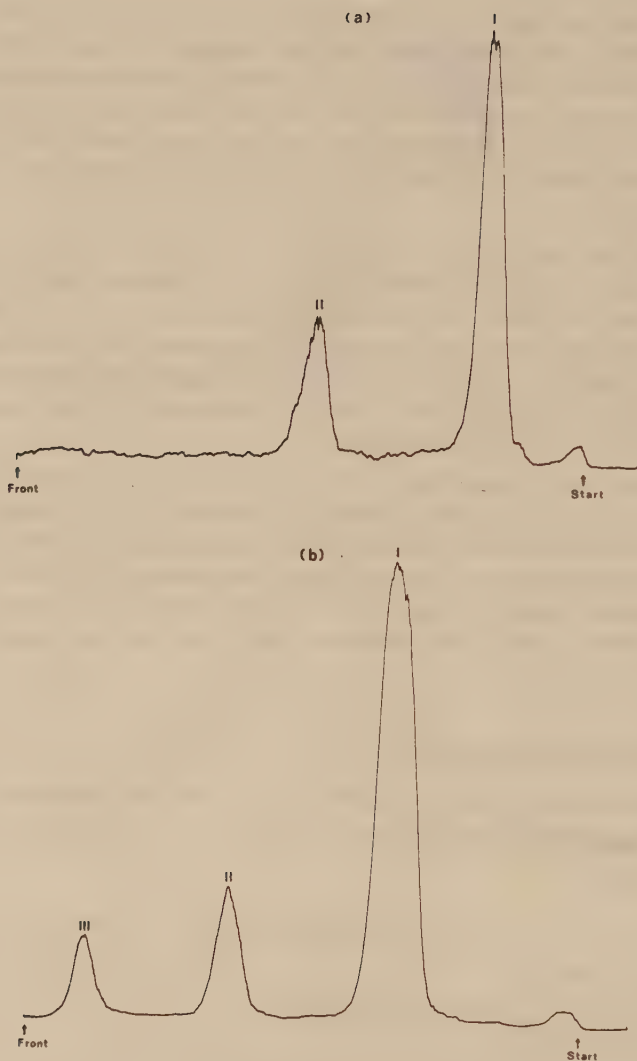


Abb. 5 Enzymatische Spaltung von [^3H]Cerebroside-sulfat durch die saure Form der Sulfatase. Radiodünnschichtchromatogramme der Hydrolyseprodukte

Die Inkubationen wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt (Abs. 4.3.1.2.). Die Dünnschichtchromatographie erfolgte an Kieselgel G-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) mit Chloroform/Methanol/Wasser (80 : 20 : 3, Vol./Vol./Vol.) als Laufmittel, die Aufzeichnung der

Abb. 5 zeigt, daß auch bei Avertebraten Cerebrosidsulfat nach dem oben angegebenen Schema schrittweise hydrolysiert wird, wenn teilangereicherte Enzympräparate verwendet werden.

Da die katalytische Wirkung der Sulfatase auf das natürliche Substrat Cerebrosidsulfat, wie unten näher ausgeführt, um Größenordnungen geringer ist als auf das chromogene Substrat Nitrocatecholsulfat, wurden die Doppelbindungen im Sphingosin- und Fettsäure-Anteil des Moleküls mit Tritiumgas hydriert (vgl. Abs. 4.2.2.), um damit die Nachweisempfindlichkeit des Lipids und seiner Abbauprodukte zu erhöhen. Die enzymatische Hydrolyse von [³H]Cerebrosidsulfat läßt sich somit durch Radiodünnschichtchromatographie quantitativ verfolgen. Die Abbauprodukte, β -D-Galactosylceramid (Abb. 5a) und in einigen Fällen auch Ceramid (Abb. 5b), letzteres infolge der Anwesenheit einer Galactosylceramid- β -D-Galactosidase in einigen Enzympräparaten, wurden dünnenschichtchromatographisch durch Vergleich mit Referenzsubstanzen identifiziert.

Da die erhaltenen Sulfatasepräparate, wie bereits in Abs. 2.1. festgestellt, nicht frei von Fremdproteinen waren, konnte die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrates Nitrocatecholsulfat und des Glycolipids Cerebrosidsulfat daher nicht mit Sicherheit der Aktivität einer Sulfatase zugeschrieben werden. Für eine Identität, die für das Enzym aus Vertebraten gesichert ist (75, 130), sprechen jedoch eine Reihe von Hinweisen: Beide Aktivitäten konnten unter gleichen Bedingungen extrahiert und mit Aceton sowie Ammoniumsulfat gefällt werden. Weiter zeigten sie ein entsprechendes isoelektrisches sowie gelchromatographisches Verhalten, d.h., die multiplen wie die monomeren und oligomeren Formen der Sulfatase ließen sowohl Arylsulfatase- als auch Cerebrosidsulfatase-Aktivität erkennen. Darüberhinaus besaßen beide Sulfatase-Aktivitäten eine identische Thermostabilität, wiesen gleiche Reaktion gegenüber einer Reihe von Inhibitoren auf (vgl. Abs. 2.2.3.5.) und zeigten ein analoges Verhalten gegenüber Aktivatoren, wie es für Enzyme aus Vertebraten beschrieben wurde (vgl. Abs. 2.2.3.1.). Eine Reihe weiterer Eigenschaften der katalytischen Reaktion verstärken diese Annahme ebenso.

Radioaktivitätsverteilung erfolgte mit einem Radiodünnschichtscanner der Fa. Berthold (Modell LB 2722). I Cerebrosidsulfat; II Cerebrosid; III Ceramid (entstanden aus II auf Grund der Anwesenheit einer Galactosylceramid- β -D-galactosidase als Verunreinigung in dem Sulfatasepräparat).

(a) *Actinia equina* (Cnidaria); (b) *Marthasterias glacialis* (Echinodermata).

Das Verhältnis von Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatasen reichte von 50 : 1 (Ratte) über 200 : 1 (*Pecten jacobaeus*) bis 1000 : 1 (*Helix pomatia*), wenn letztere in Anwesenheit von Detergenzien bestimmt wird. Wird die Cerebrosidsulfatase-Aktivität ohne Detergenzzusatz bei niedriger Ionenstärke des Puffers gemessen, so läuft diese Reaktion etwa um den Faktor 25 - 50 langsamer ab (vgl. Abs. 2.2.3.1.).

2.2.3. Eigenschaften der katalytischen Reaktion der Sulfatasen

2.2.3.1. Einfluß von Detergenzien und der Ionenstärke auf die Aktivität der Sulfatasen

Die enzymatische Hydrolyse einer Reihe komplexer Lipide wird durch die Anwesenheit verschiedener Detergenzien aktiviert (83, 54), durch hohe wie sehr niedrige Ionenstärken des Inkubationsmediums dagegen inhibiert (82). Dies konnte auch für die hier untersuchten Sulfatasen bestätigt werden, wenn Cerebrosidsulfat als Substrat verwendet wird.

Der Zusatz von rohem Natriumtaurodesoxycholat bei einer Pufferkonzentration von 0,25 M und einer Substratkonzentration von 0,6 mM erhöhte die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion etwa um den Faktor 50, wobei, wie Abb. 6 zeigt, als optimale Konzentration etwa 5 mM (berechnet für Taurodesoxycholsäure) festgestellt wurde. Das Optimum ließ keine Änderung erkennen, wenn die Bestimmung bei einem Zehntel der angegebenen Substratkonzentration durchgeführt wurde. Das Ausmaß der Aktivierung erwies sich als speciesabhängig. Einige Sulfatasepräparate wiesen jedoch auch in Abwesenheit des Detergenz' beträchtliche Cerebrosidsulfatase-Aktivität auf. In einem Falle (*Helix pomatia*) wirkte der Zusatz von Natriumtaurodesoxycholat sogar inhibierend, in Abwesenheit des Detergenz dagegen konnte Cerebrosidsulfatase-Aktivität nachgewiesen werden. Andere Detergenzien, z.B. Triton X-100, besaßen keine aktivierende Wirkung.

Die enzymatische Spaltung von Nitrocatecholsulfat wurde durch vergleichbare Konzentrationen von Natriumtaurodesoxycholat in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert. Die Restaktivität betrug zwischen 70 und 80 % der Ausgangsaktivität.

Ein Einfluß der Ionenstärke des Inkubationsmediums auf die Hydrolyse von Glykolipiden ist erst in jüngster Zeit bekannt geworden (82, 130). Eine derartige Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Pufferkonzentration konnte auch für die hier untersuchten Sulfatasen aus Avertebra-

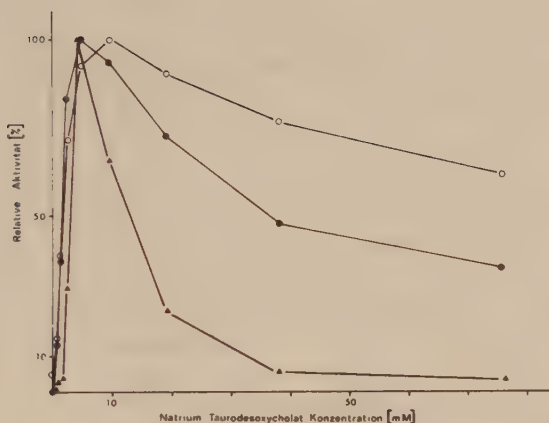


Abb. 6 Taurodesoxycholat-Abhängigkeit der Spaltung von [3 H]Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase

Die Inkubationen wurden in Anwesenheit von rohem Natriumtaurodesoxycholat wie unter Material und Methoden (Abs. 4.3.1.2.) beschrieben durchgeführt. Die Menge des zugesetzten Detergenz (mMol/l, berechnet für Taurodesoxycholat) ist der Abszisse zu entnehmen. Die Werte stellen das Mittel von wenigstens zwei Bestimmungen dar.

●—● Actinia equina (Cnidaria); ○—○ Lima inflata (Mollusca); ▲—▲ Ratte (Vertebrata).

ten sowohl mit Nitrocatecholsulfat als auch Cerebrosidsulfat als Substraten nachgewiesen werden. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, wirken hohe wie niedrige Pufferkonzentrationen gleichermaßen inhibierend. Die Spaltung von Nitrocatecholsulfat wird durch die Pufferkonzentration nur geringfügig beeinflusst. Deutlich ausgeprägt ist dagegen die Wirkung auf die Hydrolyse von Cerebrosidsulfat, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Detergenzien. In Abwesenheit dieser wiesen die Sulfatasen nur in einem engen Konzentrationsbereich Aktivität gegenüber dem Lipidsubstrat auf, wobei als optimale Pufferkonzentration etwa 0,01 M festgestellt wurde.

Da einige Sulfatasepräparate nicht frei von Galactosylceramid- β -D-galactosidase waren (vgl. Abs. 2.2.2.), ließ sich indirekt zeigen, daß auch die enzymatische Spaltung von Cerebrosiden durch niedrige Ionenstärken stimuliert wird.

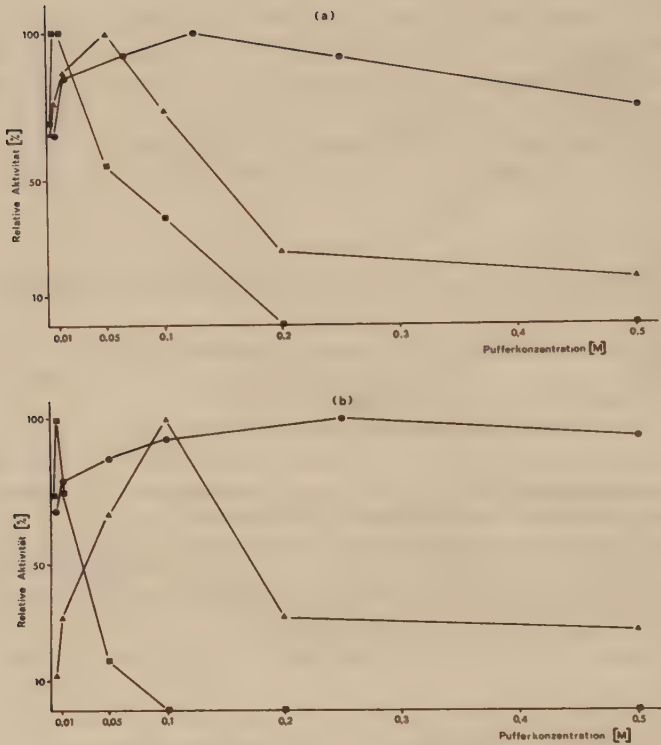


Abb. 7 Einfluß der Pufferkonzentration auf die Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase

Die Inkubationen wurden wie unter Material und Methoden (Abs. 4.3.1.1. und 4.3.1.2.) beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Pufferkonzentrationen (Mol/l) sind der Abszisse zu entnehmen. Die Arylsulfatase-Aktivität (●) wurde bei pH 6,1 (*Tethya aurantium*) bzw. 5,5 (Ratte), die Cerebrosidsulfatase-Aktivität in An- (▲) und Abwesenheit (■) von Taurodesoxycholat bei pH 6,1 (*Tethya aurantium*) bzw. 4,5 (Ratte) bestimmt. (a) *Tethya aurantium* (Porifera); (b) Ratte (Vertebrata).

2.2.3.2. Einfluß der Inkubationszeit und der Enzymkonzentration auf die Aktivität der Sulfatasen

Die enzymatische Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat und Cerebrosidsulfat durch die Sulfatasen der Wirbellosen war bei den verwendeten Bedingungen (Abs. 4.3.) wenigstens zwei Stunden proportional der Zeit (Abb. 8a), sieht man von den Enzymen einiger Tierspecies, z.B. *Patella vulgata* und

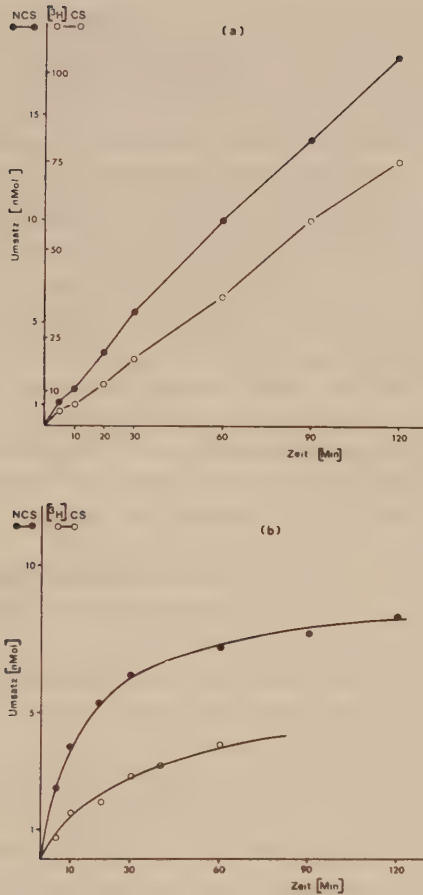


Abb. 8 Zeit-Umsatz-Kurven der Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase

Die Bestimmungsmethoden sind unter Material und Methoden (Abs. 4.3.1.1. und 4.3.1.2.) beschrieben. Substrate: Nitrocatecholsulfat (●) (15 mM) und [³H]Cerebrosidsulfat (○) (0,6 mM). Nach den in der Abbildung angegebenen Inkubationszeiten wurden aliquote Teile des Reaktionsgemisches analysiert. Die Werte stellen das Mittel aus Doppelbestimmungen dar. (a) *Pecten jacobaeus* (Mollusca); (b) Ratte (Vertebrata).

Helix pomatia, ab, wo eine geringe stetige Abnahme der Aktivität bei längeren Inkubationszeiten in Übereinstimmung mit früheren Befunden (35, 39) festgestellt wurde. Ein anomales kinetisches Verhalten jedoch,

wie es für die Enzyme aus Rinder- bzw. menschlicher Leber (112, 9, 97) berichtet wird, konnte für die Sulfatasen aus Avertebraten in keinem Fall, weder für die monomeren noch für die oligomeren Formen, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wies die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe sowohl gegenüber Nitrocatecholsulfat als auch Cerebrosidsulfat als Substrat eine derartige anomale Zeit-Umsatz-Kurve auf (Abb. 8b).

Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung von Nitrocatecholsulfat durch die Sulfatasen der Wirbellosen war auf Grund des oben Gesagten durch Division des Substratumsatzes durch die Inkubationszeit möglich. Analoges gilt für die Hydrolyse von Cerebrosidsulfat.

Dieses Verfahren konnte für die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe mit Nitrocatecholsulfat als Substrat nicht angewendet werden. Es ließ sich jedoch zeigen, daß die von Stinshoff (129) vorgeschlagene und an der sauren Form der Sulfatase aus menschlicher Leber überprüfte Beziehung zwischen Reaktionszeit (t) und Substratumsatz (u),

$$\frac{1}{u} = \frac{1}{v_0} \frac{1}{t} + \frac{1}{u_{\max}}, \quad \begin{array}{l} (v_0 = \text{Anfangsgeschwindigkeit;} \\ u_{\max} = \text{theoretischer maximaler Umsatz}) \end{array}$$

auch für die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe gilt. Sie erlaubt es, mit Hilfe einer Zeit-Umsatz-Kurve die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion graphisch zu ermitteln (Abs. 4.3.1.3.).

Für die Hydrolyse von Cerebrosidsulfat gilt, wie gezeigt werden konnte, die genannte Beziehung nicht. An Stelle der Anfangsgeschwindigkeiten mußten daher gemittelte Geschwindigkeiten verwendet werden.

Unter den verwendeten Bedingungen war die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung von Nitrocatecholsulfat und Cerebrosidsulfat der eingesetzten Enzymmenge proportional. Abweichungen von der Proportionalität im Sinne einer Hemmung der Aktivität wurden bei hoher Proteinkonzentration festgestellt, wobei der Einfluß auf die Aktivität gegenüber Nitrocatecholsulfat nicht so stark ausgeprägt war wie gegenüber Cerebrosidsulfat, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Untersucher (23, 104).

2.2.3.3. Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Sulfatasen

Der pH-Wert, bei dem eine enzymatische Reaktion die größte Anfangsgeschwindigkeit besitzt, ist als pH-Optimum dieser Reaktion definiert.

Da für die Sulfatasen der Wirbellosen lineare Reaktionszeit-Substratumsatz-Beziehungen für Nitrocatecholsulfat wie für Cerebrosidsulfat als Substrate nachgewiesen wurden (Abs. 2.2.3.2.), konnte der Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion durch Endpunktsbestimmung gemessen werden.

Die optimalen pH-Werte der Sulfatase-Reaktion sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Sie lagen für die meisten der untersuchten Tierarten im Bereich von pH 5,5 bis 6,0, erwiesen sich also trotz geringer Variationsbreite als speciesabhängig. Ein Vergleich der optimalen pH-Werte der Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat und Cerebrosidsulfat für das Enzym einer Tier-species ließ in den meisten Fällen eine gute Übereinstimmung erkennen. Von einigen Ausnahmen abgesehen, liegt das pH-Optimum bei sauereren Wer-

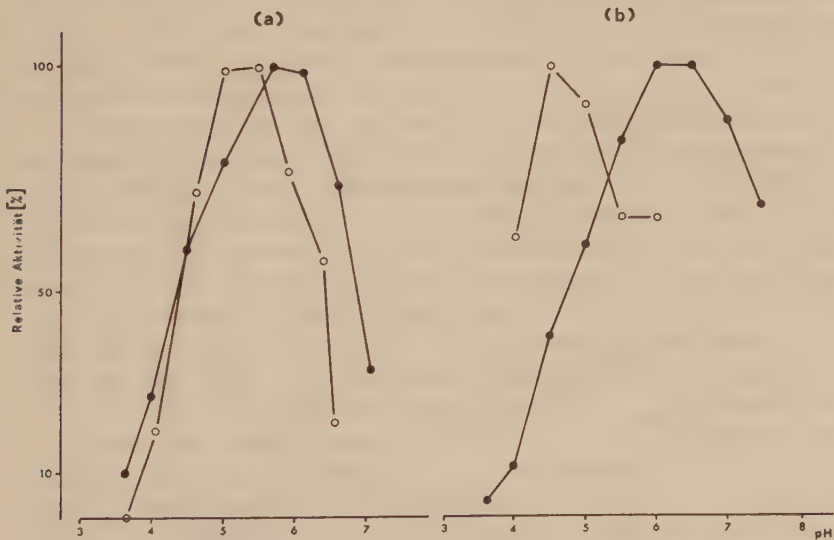


Abb. 9 Einfluß des pH-Wertes auf die Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat und [^3H]Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase der Avertebraten

Die Inkubationen wurden wie unter Material und Methoden (Abg. 4.3.1.1. und 4.3.1.2.) beschrieben mit Nitrocatecholsulfat (●) und [^3H]Cerebrosidsulfat (○) als Substraten durchgeführt.

(a) *Patella vulgata* (Mollusca); (b) *Lumbricus terrestris* (Annelida).

ten, wenn an Stelle von Nitrocatecholsulfat Cerebrosidsulfat als Substrat verwendet wird. Wie aus Abb. 9 zu entnehmen ist, sind die Sulfatasen über einen weiten Bereich, etwa zwischen pH 3 und 8, aktiv.

Zwischen den pH-Optima der enzymatischen Spaltung des Lipidsubstrates, die in Anwesenheit von Detergenzien und hoher Pufferkonzentration (0,25 M), und denen, die in Abwesenheit jener bei niedriger Pufferkonzentration (0,01 M) bestimmt wurden, konnte, soweit geprüft, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die pH-Optima der oligomeren Formen und der monomeren Form der Sulfatase einer Species ließen Übereinstimmung erkennen, wogegen die Arylsulfatase-Reaktion der multiplen Formen des Enzyms unterschiedlich auf eine pH-Wert-Änderung reagierten.

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität der sauren Form der Sulfatase aus Rattengewebe gegenüber Nitrocatecholsulfat als Substrat mußte, da sich die Anfangsgeschwindigkeit nicht direkt bestimmen ließ (vgl. Abs. 2.2.3.2.), mit Hilfe einer Reihe von Zeit-Umsatz-Kurven ermittelt werden (vgl. Abs. 4.3.). In Abb. 10a sind einige dieser Kurven, die bei verschiedenen pH-Werten (Pufferkonzentration: 0,25 M) erhalten wurden, dargestellt, Abb. 10b zeigt die doppelt reziproke Darstellung der Werte aus Abb. 10a. Die daraus graphisch ermittelten Reaktionsparameter, Anfangsgeschwindigkeit v_0 (nMol NC / Min.), maximaler Umsatz $u_{\max}$ (nMol NC) und Halbwertszeit der Inaktivierung $t_{1/2}$ (Min.) sind in Abb. 11 graphisch dargestellt. Das Maximum der Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat und damit das pH-Optimum liegt im Bereich zwischen pH 5,8 und 6,0 und somit bei alkalischeren Werten als den bisher für die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe angegebenen (23, 43). Der maximale Umsatz an Substrat $u_{\max}$, d.h. der theoretisch erreichbare Wert bei unendlicher Inkubationszeit, fällt mit steigendem pH-Wert ab. Entsprechendes gilt für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ als Maß für die Inaktivierungsgeschwindigkeit: Sie sinkt mit steigendem pH-Wert. Das bedeutet, daß im Bereich des pH-Optimums die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms und die Anfangsgeschwindigkeit der katalytischen Reaktion ihren höchsten Wert erreichen. Diese Befunde stimmen qualitativ mit den von Stinshoff (130) berichteten überein.

Die Zeit-Umsatz-Kurve der Hydrolyse von Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase aus Rattengewebe und ihre pH-Abhängigkeit ist in Abb. 12 an zwei Beispielen aufgezeigt. Sie hat einen ähnlichen Verlauf wie die entsprechende Kurve der Spaltung von Nitrocatecholsulfat; die von Stinshoff (129) angegebene Beziehung zwischen Reaktionszeit und Um-

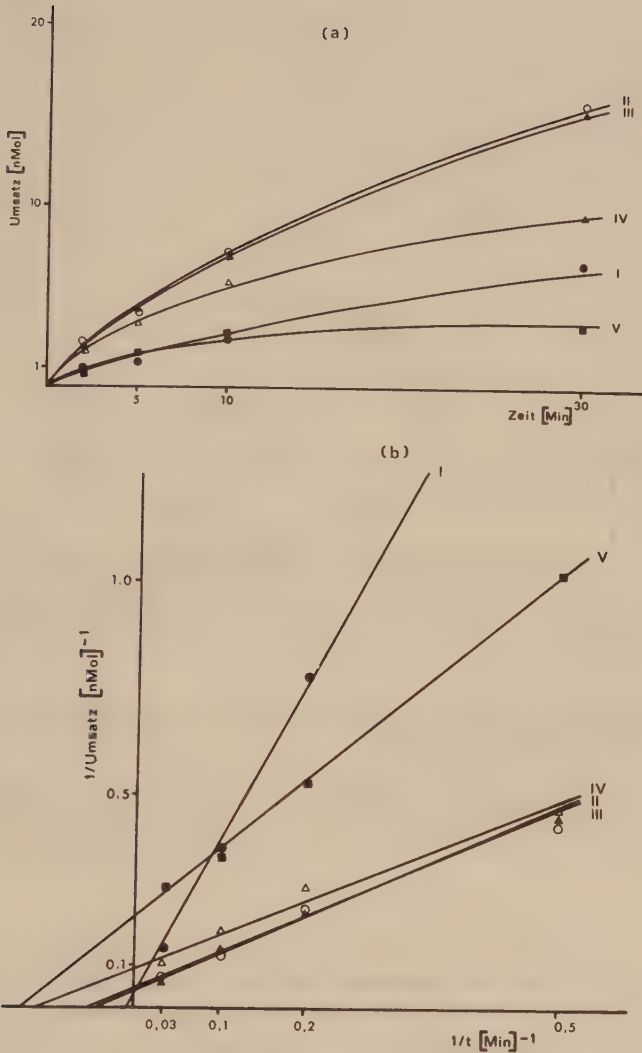


Abb. 10 Zeit-Umsatz-Kurven der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Inkubationen wurden wie unter Abs. 4.3.1.1. beschrieben bei pH-Werten von 4,1 (I), 5,0 (II), 5,4 (III), 6,0 (IV) und 7,0 (V) durchgeführt. Nach den angegebenen Zeiten wird der Substrat-Umsatz aliquoter Teile des Reaktionsgemisches bestimmt. Die angegebenen Werte stellen das Mittel aus wenigstens zwei Bestimmungen dar.

(a) Zeit-Umsatz-Kurven; (b) doppelt-reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurven.

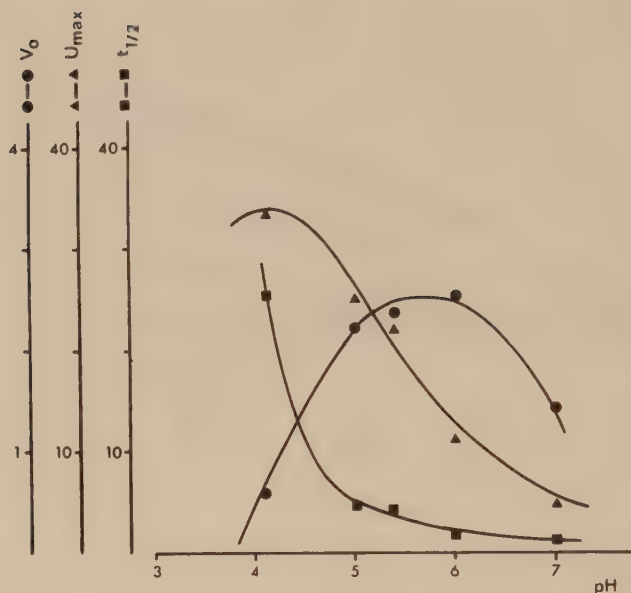


Abb. 11 Anfangsgeschwindigkeit, maximaler Umsatz und Halbwertszeit der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die dargestellten Werte wurden nach der von Stinshoff (129) angegebenen Methode graphisch aus Abb. 10b ermittelt. Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 (●) der Reaktion hat die Dimension nMol freigesetztes NC / Min., der maximale Umsatz u_{max} (▲) nMol freigesetztes NC und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (■) Min.

satz ist jedoch auf diesen Kurventyp nicht anwendbar. Es lassen sich also keine Aussagen über die Parameter der Reaktion machen. Man erkennt jedoch, daß die Geschwindigkeit der Inaktivierung des Enzyms bei höherem pH-Wert größer, die Halbwertszeit daher kleiner ist, in Analogie zu den Verhältnissen bei der Spaltung von Nitrocatecholsulfat. In Abb. 13 ist die pH-Abhängigkeit der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatase, gemessen mittels Endpunktbestimmung (Pufferkonzentration: 0,25 M), dargestellt. Das Optimum liegt bei einem pH-Wert von 4,5.

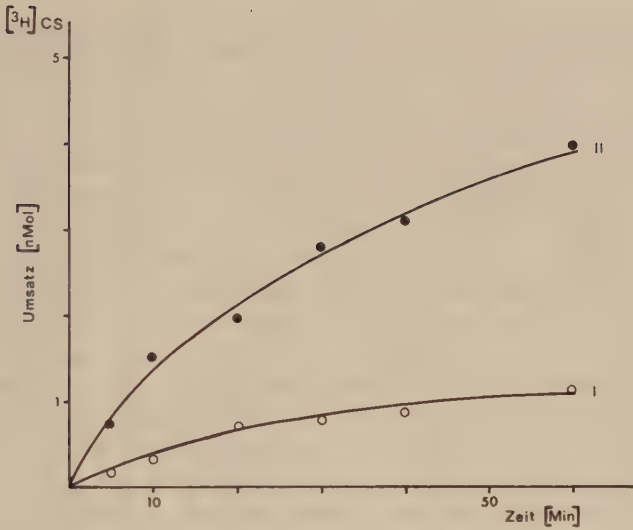


Abb. 12 Zeit-Umsatz-Kurven der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Inkubationen wurden wie unter Abs. 4.3.1.2. beschrieben bei pH-Werten von 4,0 (I) und 5,0 (II) durchgeführt. Nach den angegebenen Zeiten wird der Umsatz an Substrat aliquoter Teile des Reaktionsgemisches bestimmt.

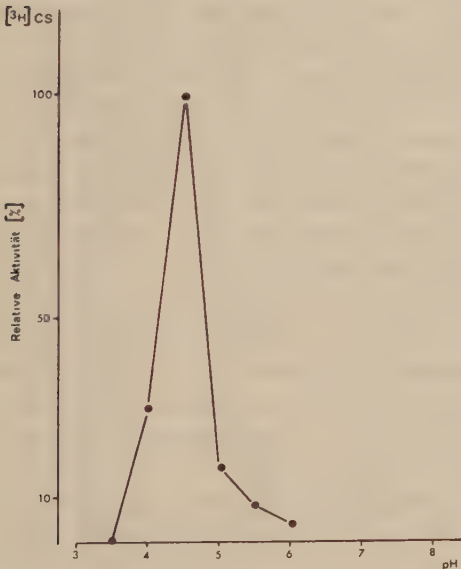


Abb. 13 Einfluß des pH-Wertes auf die Hydrolyse von $[^3\text{H}]$ Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase der Ratte

Die Inkubationen wurden bei den angegebenen pH-Werten wie unter Abs. 4.3.1.2. beschrieben durchgeführt.

Tab. 4 Scheinbare kinetische Konstanten der teilangereicherten Sulfatasen verschiedener Avertetraten und der Ratte, bestimmt mit Nitrocathecolsulfat und [^3H]Cerebrosidsulfat als Substraten

Die scheinbaren Michaeliskonstanten wurden nach Lineweaver und Burk (81) bestimmt. Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatasen wurde in Anwesenheit von rohem Taurodeoxycholat (0,25 %, Gew./Vol.) gemessen. Die experimentellen Einzelheiten sind in den Abs. 4.3.1.1. bis 4.3.1.3. beschrieben. Die angegebenen Werte stellen das Mittel aus wenigstens zwei Bestimmungen dar.

Tierart	Substrate Multiple Formen der Sulfatasen	pH-Optimum			K _m -Werte [mM]		
		NCS	[^3H]CS	A	NCS	[^3H]CS	A
<i>Tethya aurantium</i>							
<i>Actinia equina</i>		6,2	5,9	6,1	6,6	3,3	1,25
<i>Patella vulgata</i>		5,8	5,9	5,7	-	0,6	0,7
<i>Helix pomatia</i>		2)	5,8	5,4	2)	0,75	0,6
<i>Lima inflata</i>		2)	7,5	6,0	2)	0,25	3,3
<i>Pecten jacobaeus</i>		-	5,8	5,9	-	0,4	0,7
<i>Lumbricus terrestris</i>		-	5,9	5,5	-	0,5	1,25
<i>Maja squinado</i>		5,7	6,3	4,7	7,7	1,25	0,8
<i>Blaberus spec.</i>		-	6,0	-	-	-	-
<i>Holothuria forskali</i>		5,5	5,4	5,9	3,3	2,0	-
<i>Marthasterias glacialis</i>		-	5,9	-	-	-	-
<i>Microcosmus sulcatus</i>		6,4	5,9	5,8	-	1,25	1,5
		-	5,8	5,9	-	0,8	1,4
Ratte		5,8	5,9	4,5	1,0	2,2	0,5

1) A und B bezeichnen die saure bzw. basische Form der Sulfatasen.

2) Mittels Elektrofokussierung ließen sich nur Spuren an basischer Form nachweisen (vgl. Tab. 2).

2.2.3.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Sulfatasen

Die scheinbaren Michaelis-Konstanten der Arylsulfatase- und der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatasen der Avertebraten wurden graphisch nach Lineweaver und Burk (81) ermittelt und sind in Tab. 4 zusammengestellt. Zwei Beispiele werden in Abb. 14 gegeben. Die Michaelis-Konstanten für die sauren Formen der Sulfatasen aller untersuchten Species lagen für beide Substrate in der gleichen Größenordnung, um 1,5 mM, während für die basischen Formen, soweit untersucht, etwas höhere Werte bestimmt wurden. Zwischen den oligomeren Formen und der monomeren Form der Sulfatase einer Species konnten, soweit geprüft, keine größeren Unterschiede nachgewiesen werden. Nur in einem Fall wurde Substratinhibition gefunden (*Helix pomatia*; Abb. 14), jedoch nur mit Nitrocatecholsulfat, nicht dagegen mit Cerebrosidsulfat, vermutlich auf Grund der niedrigen Konzentrationen des Lipidsubstrates, die aus experimentellen Gründen in den Versuchen verwendet wurden.

Die Bestimmung der scheinbaren Michaelis-Konstanten für die saure Form der Sulfatase der Ratte mit Nitrocatecholsulfat als Substrat erfolgte, wie die Ermittlung des optimalen pH-Wertes, mit Hilfe einer Reihe von Zeit-Umsatz-Kurven. In Abb. 15a sind diese Kurven für verschiedene Nitrocatecholsulfat-Konzentrationen dargestellt, Abb. 15b zeigt die doppelt reziproke Darstellung dieser Kurven. An Hand dieser Darstellung läßt sich erkennen, daß für alle Substratkonzentrationen bei unendlich langer Reaktionszeit der gleiche theoretische maximale Umsatz ($u_{\max}$) zu erwarten ist, was gleichbedeutend damit ist, daß sich die Michaelis-Konstanten bei unendlicher Inkubationszeit dem Wert Null asymptotisch nähern. Dieses Verhalten wird in Abb. 16 dokumentiert. In Tab. 5 sind die graphisch ermittelten Parameter der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte zusammengestellt. Mit Hilfe der dort aufgeführten Werte für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration läßt sich die scheinbare Michaelis-Konstante bestimmen (Abb. 17); sie beträgt 2,2 mM Nitrocatecholsulfat.

Die Ermittlung der scheinbaren Michaelis-Konstanten für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte erfolgte durch Endpunktsbestimmung (Abs. 2.2.3.2.). In Abb. 18 sind die Michaelis-Kurve und die Lineweaver-Burk-Darstellung dieser Kurve wiedergegeben. Aus letzterer läßt sich ein K_m -Wert von 0,5 mM Cerebrosidsulfat ermitteln, der wahrscheinlich zu klein ist, da der Bestimmung nicht die An-

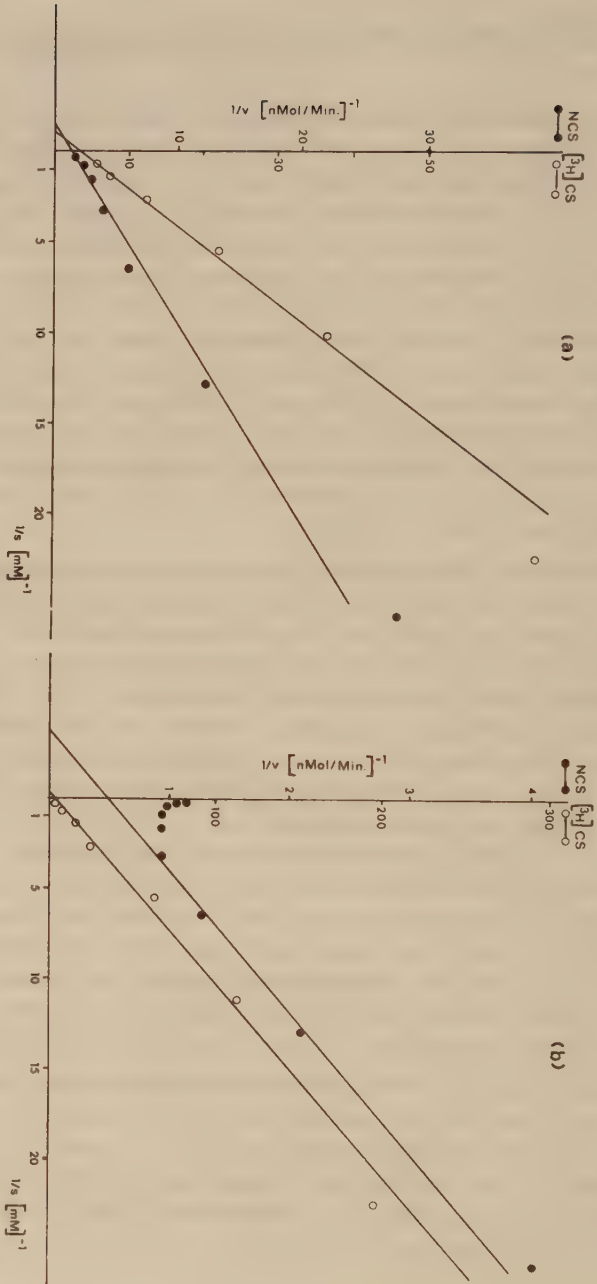


Abb. 14 Einfluß der Substratkonzentration auf die Hydrolyse von Nitrocathecholsulfat und [³H]Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase der Avertebraten

Lineaveer-Burk-Darstellung (81) der Michaelis-Kurven der Sulfatase-Reaktion. Die Inkubationen wurden mit Nitrocathecholsulfat (●) und [³H]-Cerebrosidsulfat (○) als Substraten wie in Abs. 4.3.1.1. und 4.3.1.2. beschrieben durchgeführt.

(a) Actinia equina (Cnidaria); (b) Helix pomatia (Mollusca).

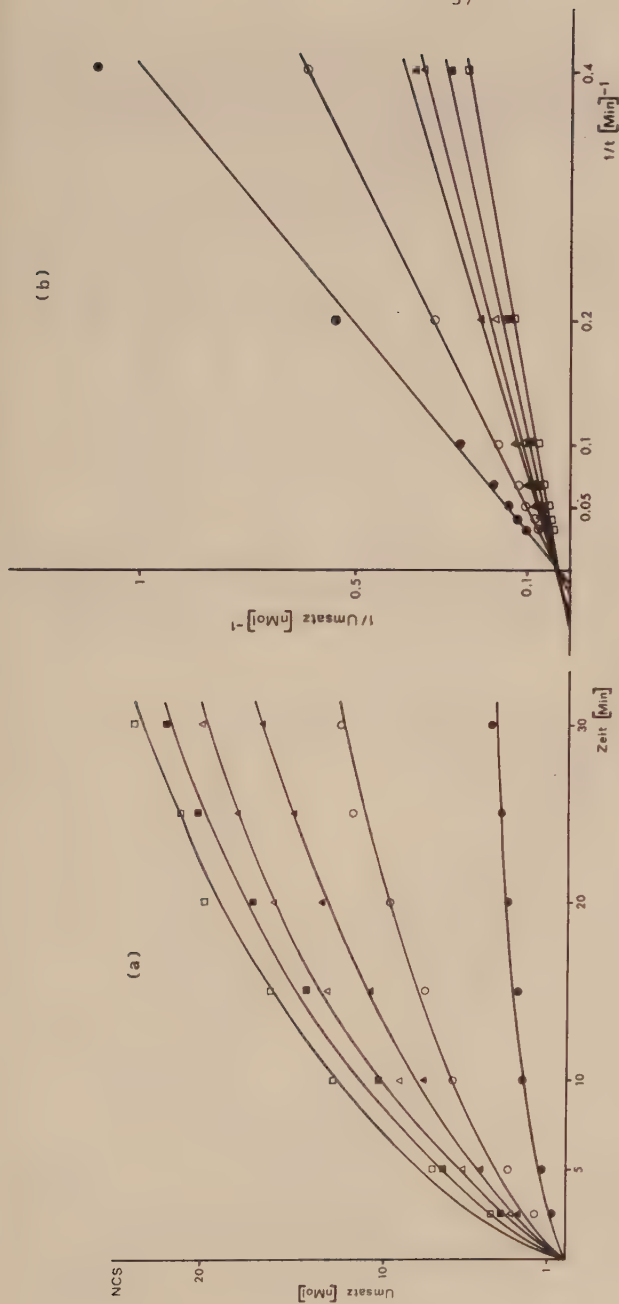


Abb. 15

Zeit-Umsatz-Kurven der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Die Inkubationen wurden wie unter Abs. 4.3.1.1. beschrieben mit Substratkonzentrationen von 0,31 ($\bullet$), 1,25 ($\circ$), 2,5 (Δ), 5,0 (Δ), 10,0 ($\square$) und 20,0 mM ($\square$) durchgeführt. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Substratumsatz aliquoter Teile des Reaktionsgemisches bestimmt. Die angegebenen Werte stellen das Mittel aus wenigstens zwei Bestimmungen dar.

(a) Zeit-Umsatz-Kurven; (b) Doppelt reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurven.

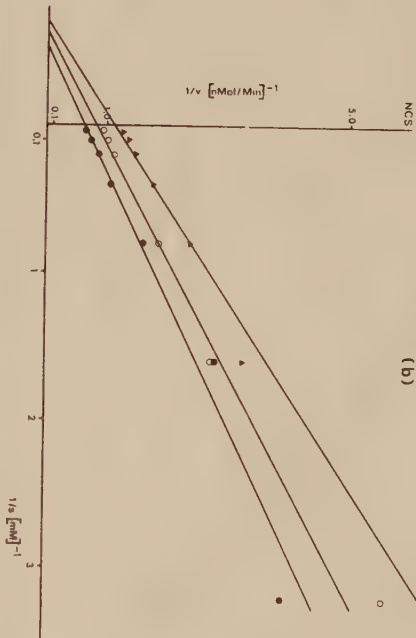
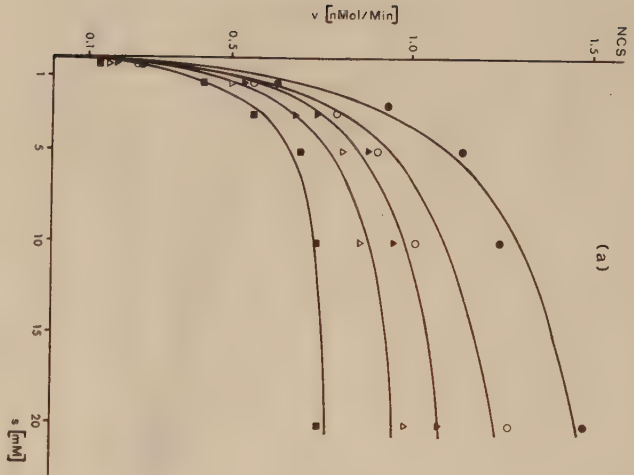


Abb. 16 Michaelis-Kurven und Lineweaver-Burk-Darstellung dieser Kurven der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Die Inkubationsbedingungen sind Abb. 15 zu entnehmen. Den Michaelis-Kurven und den entsprechenden Lineweaver-Burk-Darstellungen liegen die Substrat-Umsätze nach einer Reaktionszeit von 5 (●), 10 (○), 15 (▲), 20 (△) und 30 Min. (■) zugrunde.

(a) Michaelis-Kurven; (b) Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Kurven.

Tab. 5 Einfluß der Substratkonzentration auf die Parameter der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte

Die Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität erfolgte wie in Abs. 4.3.1.1. beschrieben. Die Reaktionsparameter wurden, wie in Abs. 4.3.1.3. dargestellt, durch graphische Auswertung einer Reihe von Zeit-Umsatz-Kurven ermittelt.

Substratkonzentration [mM]	v_o ¹⁾ [nMol NC/Min.]	$u_{\max}$ ²⁾ [nMol NC]	$t_{1/2}$ ³⁾ [Min.]
0,31	0,8	40	20,9
0,63	1,2	40	13,6
1,25	2,2	40	7,6
2,5	3,2	40	5,1
5,0	3,6	40	4,6
10,0	4,3	40	3,9
20,0	5,4	40	3,1

1) Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion.

2) Theoretischer maximaler Substratumsatz.

3) Halbwertszeit der Inaktivierung des Enzyms.

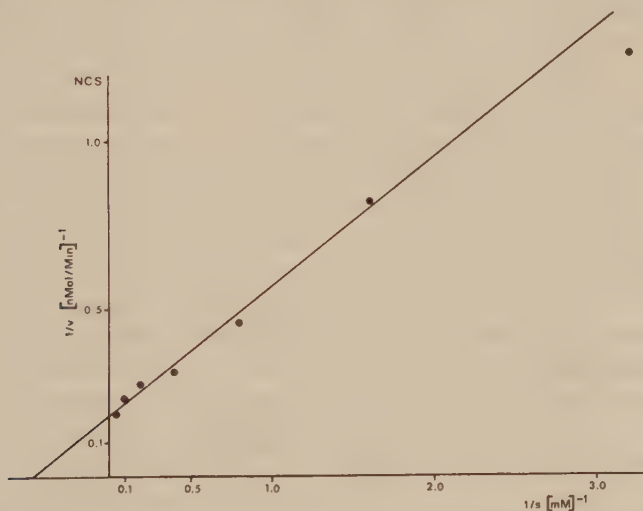


Abb. 17 Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurden Tab. 5 entnommen.

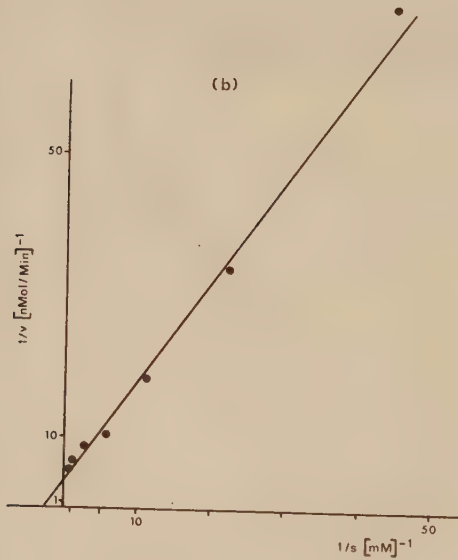
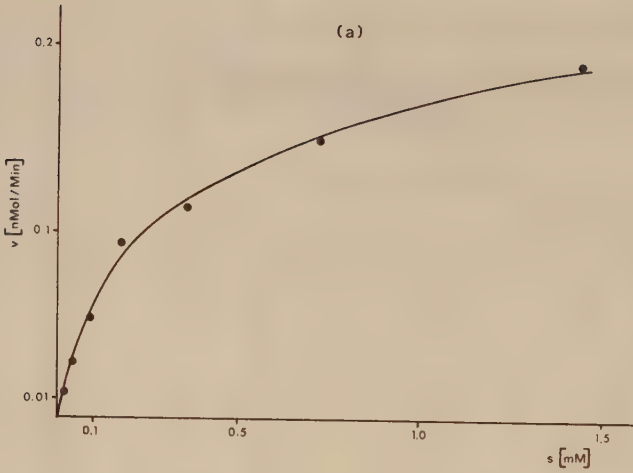


Abb. 18 Einfluß der Substratkonzentration auf die Spaltung von [^3H]-Cerebrosidsulfat durch die saure Form der Sulfatase der Ratte
Die Reaktionsbedingungen sind unter Abs. 4.3.1.2. beschrieben.
(a) Michaelis-Kurve; (b) Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Kurve.

fangsgeschwindigkeit der Reaktion zugrunde gelegt werden konnte.

Cerebrosidsulfat ist ein amphiphiles Lipid, das in wässrigem Medium micellar dispergiert ist (123). Die kritische micellare Konzentration des Lipids ist nicht bekannt, kann jedoch aus Analogiegründen erheblich kleiner als 0,1 mM angenommen werden (101). Da, wie aus Abb. 18b hervorgeht, die Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Avertebraten wie der Ratte im untersuchten Substratkonzentrationsbereich der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht, läßt sich vermuten, daß das Enzym Cerebrosidsulfat nicht in seiner molekular, sondern in seiner micellar dispersen Form hydrolysiert (53).

2.2.3.5. Einfluß einiger Inhibitoren auf die Aktivität der Sulfatasen

Phosphat-, Sulfit- und Sulfationen sind als Inhibitoren des Typs 2 der Arylsulfatase beschrieben worden (38, 115). Sie erwiesen sich bei einer Konzentration von 5 mM im Inkubationsgemisch als starke Inhibitoren der Arylsulfatase- wie der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase. Phosphat (K_2HPO_4) und Sulfit (Na_2SO_3) inhibierten beide Enzymaktivitäten etwa zu 80 - 95 %, Sulfat (Na_2SO_4) dagegen nur zu 15 - 45 %. Drei Beispiele sind in Tab. 6 aufgeführt. Obwohl die Hemmwirkung in speciesabhängiger Weise variierte, ist diese jedoch für die beiden Sulfatase-Aktivitäten einer Tierart praktisch identisch.

Durch Konkurrenzversuche mit beiden Substraten konnte gezeigt werden, daß Nitrocatecholsulfat die Cerebrosidsulfatase-Aktivität und Cerebrosidsulfat die Arylsulfatase-Aktivität inhibiert. Nach geeigneter Korrektur der Hemmwirkung der Spaltprodukte der Arylsulfatase-Reaktion erniedrigte Nitrocatecholsulfat in einer Konzentration von 10 mM die Cerebrosidsulfatase-Aktivität auf etwa 70 % und Cerebrosidsulfat in einer Konzentration von 0,1 mM die Arylsulfatase-Aktivität auf etwa 70 - 60 % der Ausgangsaktivität. Die Hemmung der Arylsulfatase-Reaktion durch Cerebrosidsulfat ist von der Anwesenheit von Natriumtaurodesoxycholat unabhängig, auch bei Pufferkonzentrationen, z.B. 0,25 M, bei denen ohne Aktivatorzusatz keine Cerebrosidsulfatase-Aktivität nachweisbar ist (Abs. 2.2.3.1.). Dies deutet darauf hin, daß eine Bindung von Cerebrosidsulfat an das Enzym auch bei hohen Ionenstärken unabhängig von der Anwesenheit des Detergenz erfolgt.

Antikörper hemmen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, die Aktivität der Enzyme (21). Da Concanavalin A mit Glykoproteinen Komplexe analog einem Antigen-Antikörper-Komplex (56, 98) bildet, wurde die Wirkung dieses Lek-

Tab. 6 Einfluß von Sulfat, Sulfit und Phosphat auf die Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase

Die Inkubationen wurden wie in Material und Methoden (Abs. 4.3.1.1. und 4.3.1.2.) angegeben in Anwesenheit von 5 mM Natriumsulfat, Natriumsulfit und Kaliumphosphat durchgeführt. Die aufgeführten Zahlen sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Inhibitoren [5mM]	Tierart	Substrate	% Inhibierung	
			NCS	[³ H]CS
	Pecten jacobaeus			
Sulfat			42	45
Sulfit			86	84
Phosphat			80	87
	Marthasterias glacialis			
Sulfat			29	35
Sulfit			78	85
Phosphat			80	87
	Ratte			
Sulfat			15	16
Sulfit			97	98
Phosphat			91	94

tins auf die Sulfatase-Aktivitäten geprüft (vgl. Abs. 2.2.1.4.). Das Ausmaß der Hemmung der Sulfatase-Reaktion erwies sich als abhängig von der untersuchten Species und bewegte sich zwischen 0 und 60 % der Kontrollaktivität, wenn Nitrocatecholsulfat als Substrat verwendet wurde; in einem Falle (*Patella vulgata*) erwies sich das Lektin als gering aktivierend (vgl. 12). Mit Cerebrosidsulfat als Substrat wurde, soweit geprüft, gleiche oder etwas stärkere Hemmung der Sulfatase-Aktivität festgestellt. Die Speciesabhängigkeit der Inhibition durch Concanavalin A deutet darauf hin, daß sich der Kohlenhydratanteil der verschiedenen Sulfatasen in unterschiedlicher Entfernung vom aktiven Zentrum des Enzyms befindet und/oder daß Unterschiede im Gehalt von Glucose, Mannose

oder sterisch verwandter Verbindungen vorhanden sind. An der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes scheint der Kohlenhydratanteil nicht beteiligt zu sein, da dann vollständige Hemmung auftreten sollte.

2.3. Intrazelluläre Lokalisation der Sulfatasen im Vergleich mit anderen sauren Hydrolasen

2.3.1. Subzelluläre Lokalisation der Sulfatasen im Rattengehirn

Die intrazelluläre Verteilung dreier saurer Hydrolasen, Sulfatase (saure und basische Form), β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase, im Rattengehirn wurde für drei verschiedene Altersgruppen mit Hilfe des von Koenig et al. (77) angegebenen Aufarbeitungs- und Zentrifugations-schemas untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 - 21 in Form von Histogrammen dargestellt. Das Protein verteilte sich prozentual in folgender Weise auf die Primärfractionen (vgl. Abs. 4.10) N (Kerne und Zellfragmente), M (rohe Mitochondrien), P (Mikrosomen) und S (Lösliches): 25 - 30, 40 - 45, 9 - 12 und 18 - 21. Die Hauptmenge der Enzyme, nämlich 45 - 65 % der Gesamtaktivität, fand sich in Fraktion M, obwohl die relative spezifische Aktivität (RSA) der rohen Kernfraktion (N) in einigen Fällen (vgl. z.B. Abb. 20b) höher war als die der rohen Mitochondrienfraktion (M). Die Verteilungsmuster der drei sauren Hydrolasen der Primärfractionen ließen eine beträchtliche Variabilität erkennen. Die Subfractionen A (Myelin und Membranen), B (Nervenendigungen), C (Nervenendigungen, einige Mitochondrien) und D (Mitochondrien) (77) der rohen Mitochondrienfraktion enthielten die Hauptmenge des Proteins, etwa 95 %, während Fraktion E (Lysosomen, degenerierende Mitochondrien) nur 4 - 6 % enthielt. Andererseits fand sich in Fraktion E ein relativ großer Anteil der sauren Hydrolasen, nämlich 15 - 40 % der Gesamtaktivität. Daraus berechnete sich eine relative spezifische Aktivität von 3 - 10 für die untersuchten Hydrolasen in Fraktion E, die damit erheblich höher war als die der Fractionen A bis D, was Sulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher als lysosomale Enzyme auswies (121, 77, 68).

Die spezifischen Aktivitäten der drei sauren Hydrolasen der einzelnen subzellulären Fractionen, Primär- wie Sekundärfractionen, und des Homogenats unterschieden sich zum Teil erheblich. Dieser Befund deutet auf ein unterschiedliches Sedimentationsverhalten von Lysosomen hin, die sich in ihrem Enzymgehalt voneinander unterscheiden. Somit erscheint die Lysosomenpopulation des Gesamtgehirns heterogen, eine uniforme En-

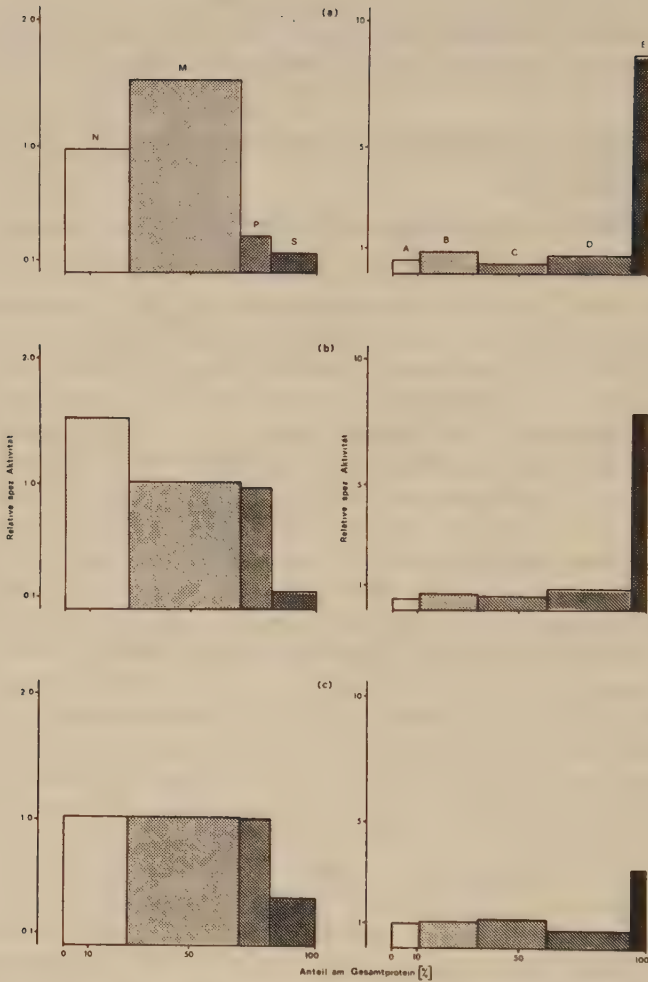


Abb. 19

Abb. 19 - 21 Subzelluläre Verteilung dreier saurer Hydrolasen im Ratengehirn in Abhängigkeit vom Alter der Tiere

Die Fraktionierung der Gehirnhomogenate wurde nach Koenig et al. (77) wie unter Abs. 4.10. beschrieben durchgeführt. Im linken Histogramm sind die relativen spezifischen Aktivitäten (RSA) der Fraktionen dar-



Abb. 20

gestellt, die nach Differentialzentrifugation des Homogenats, im rechten Histogramm die Fraktionen, die nach isopyknischer Zentrifugation von Fraktion M über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten erhalten wurden. Die Fraktionen werden in der Reihenfolge ihrer Isolierung aufgeführt. Ordinate: Relative spezifische Aktivität (prozentualer Anteil der Fraktion an der Gesamtzymaktivität / prozentualer Anteil

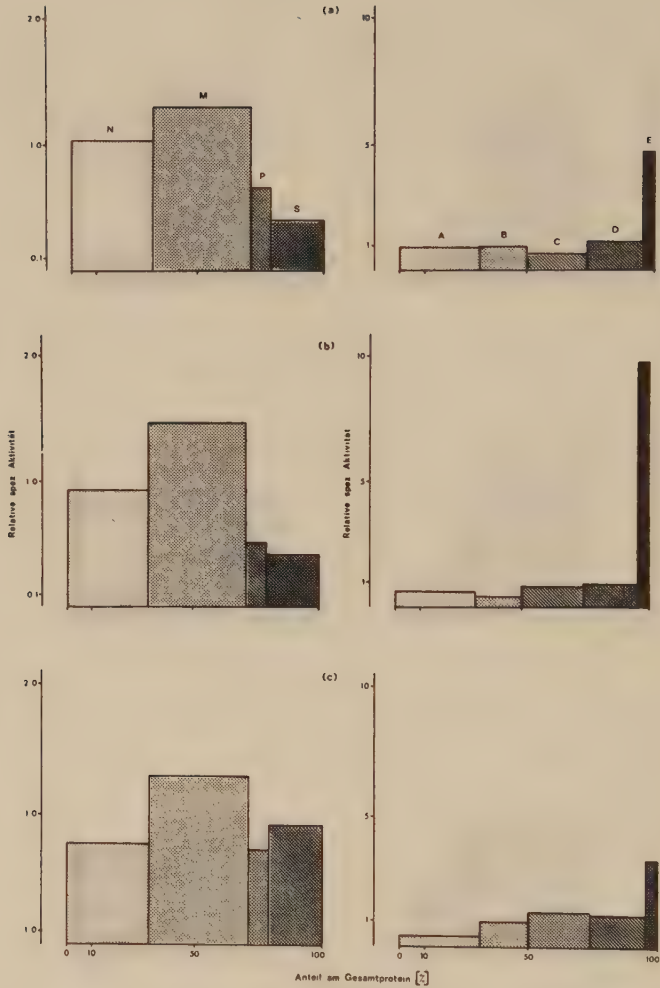


Abb. 21

der Fraktion am Gesamtprotein); Abszisse: Prozentualer Anteil der Fraktionen am Gesamtprotein.

(a) Arylsulfatase (saure und basische Form); (b) β -N-Acetylglucosaminidase; (c) saure Phosphatase.

Abb. 19: Alter der Tiere 3 - 6 Tage (4 Bestimmungen); Abb. 20: Alter der Tiere 13 - 21 Tage (6 Bestimmungen); Abb. 21: Alter der Tiere >360 Tage (2 Bestimmungen).

zyenausstattung dieser Organellen als nicht wahrscheinlich.

2.3.2. Nachweis "lysosomaler" Enzyme bei Wirbellosen

Die lysosomale Lokalisation sowohl der sauren (= Cerebrosidsulfatase) wie der basischen Form der Sulfatase der Wirbeltiere ist mehrfach nachgewiesen (36, 113) und hier bestätigt worden (Abs. 2.3.1.). Obwohl Sulfatasen mit Arylsulfatase- und mit Cerebrosidsulfatase-Aktivität unter den Wirbellosen weit verbreitet sind, wie durch diese Untersuchung gezeigt werden konnte, ist über ihre subzelluläre Lokalisation nur sehr wenig bekannt (32, 33).

Tab. 7 Verhältnis der Aktivitäten von Sulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und saurer Phosphatase verschiedener Invertebraten

Die Aktivitäten (mU/mg Protein) der drei sauren Hydrolasen wurden in dialysierten Pufferextrakten, wie unter Material und Methoden (Abs. 4.3.) beschrieben, bestimmt. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

Tierart	Arylsulfatase	β -N-Acetylglucosaminidase	Saure Phosphatase
<i>Tethya aurantium</i>	1	0,7	0,4
<i>Actinia equina</i>	1	22,6	8,8
<i>Patella vulgata</i>	1	1)	1)
<i>Helix pomatia</i>	1	1)	1)
<i>Lima inflata</i>	1	1,0	0,2
<i>Pecten jacobaeus</i>	1	1,0	0,7
<i>Lumbricus terrestris</i>	1	6,1	2,0
<i>Maja squinado</i>	1	1,9	0,1
<i>Blaberus spec.</i>	1	13,5	18,8
<i>Holothuria forsk.</i> ⁰ <i>ali</i>	1	0,2	0,9
<i>Marthasterias glacialis</i>	1	0,7	0,4
<i>Microcosmus sulcatus</i>	1	4,1	0,4

1) Als Ausgangsmaterial wurde ein käufliches Acetontrockenpulver verwendet, daher erfolgte keine Berechnung.

Um von biochemischem Standpunkt aus einer Klärung näherzukommen, wurde das Vorkommen weiterer Enzyme, die bei Wirbeltieren lysosomalen Ursprungs sind (32), geprüft. So konnten β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase in den Gewebsextrakten aller untersuchten Avertebraten in einem speciesabhängigen Verhältnis nachgewiesen werden (Tab. 7). Dies steht in Einklang mit dem Befund, daß in einigen der erhaltenen Enzympräparate indirekt Galactosylceramid- β -D-galactosidase nachzuweisen war (Abs. 2.2.3.1., Abb. 5), ein Enzym, das Cerebrosid, das Produkt der Sulfatase-Reaktion, weiter zu Ceramid hydrolysiert und bei Vertebraten in den Lysosomen gefunden wurde (145). Darüberhinaus zeigten alle genannten Enzyme ein Extraktionsverhalten, das dem der Enzyme der Wirbeltiere entsprach. Demnach dürfte auch bei Wirbellosen eine lysosomale Lokalisation der sauren Hydrolasen nicht ausgeschlossen sein.

2.4. Altersabhängige Veränderungen der Sulfatasen der Ratte

2.4.1. Postnatale Veränderungen der Aktivität der Sulfatasen im Rattengehirn

Die Aktivitäten der Sulfatasen und im Vergleich dazu der β -N-Acetylglucosaminidase und der sauren Phosphatase des Gehirns der Ratte in Abhängigkeit vom Alter der Tiere wurden in einem 2 %-igen Homogenat (Aufarbeitungsschritt (a), Abs. 4.9.) nach Dialyse gegen Wasser (dest.) bestimmt. Das Aktivitätsverhältnis von saurer und basischer Form der Sulfatase wurde nach isoelektrischer Fokussierung eines rohen, dialysierten Extraktes (Aufarbeitungsschritt (b), Abs. 4.9.) durch Summation der Einzelextinktionen der beiden Enzympeaks berechnet. Die häufig verwendete, weniger arbeitsaufwendige Methode der differentiellen Bestimmung der beiden Formen der Sulfatase nach Baum et al. (11) ist auf Grund besonderer Eigenschaften der Enzyme aus Rattengewebe nicht anwendbar, was später von anderer Seite bestätigt wurde (151). Den Arylsulfatase-Aktivitäten liegen Messungen des Substratumsatzes nach Inkubationszeiten von 5 Min. (Abs. 2.2.3.2.) zugrunde. Jeder Punkt der Abb. 22 und 23 repräsentiert den Mittelwert der Ergebnisse aus wenigstens sechs untersuchten Organen. Als Vergleichsorgan diente die Niere der Ratte.

Wie aus Abb. 22 hervorgeht, wies der Proteingehalt des Gehirns im Gegensatz zur Niere eine deutliche Altersabhängigkeit auf. Einer starken Zunahme von etwa 70 auf etwa 120 mg Protein/g Feuchtgewebe vom 1. bis zum 25. Tag post partum folgte ein geringerer Zuwachs, bis der Adultwert von etwa 130 mg Protein/g Feuchtgewebe im Alter von 2 - 3 Monaten er-

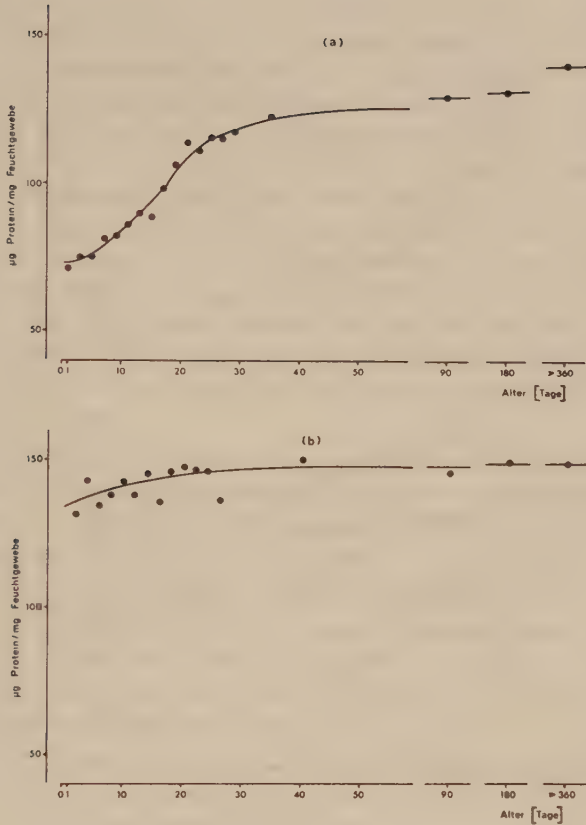


Abb. 22 Proteingehalt des Gehirns und der Niere während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie der Ratte

Der Proteingehalt der Gewebe wurde nach Lowry et al. (84) unter Verwendung 2 %iger Homogenate bestimmt. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert der Ergebnisse aus wenigstens sechs untersuchten Organen dar. (a) Gehirn; (b) Niere.

reicht war. Ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten (24, 107) zeigt in der Tendenz gute Übereinstimmung, die hier gemessenen Werte scheinen jedoch etwas zu hoch zu sein, was möglicherweise auf die längere Lagerung der Gewebe bei -20°C zurückzuführen ist.

Abb. 23a gibt die spezifischen Aktivitäten der Sulfatase (Gesamtaktivität), β -N-Acetylglucosaminidase und sauren Phosphatase im Gehirn in Ab-

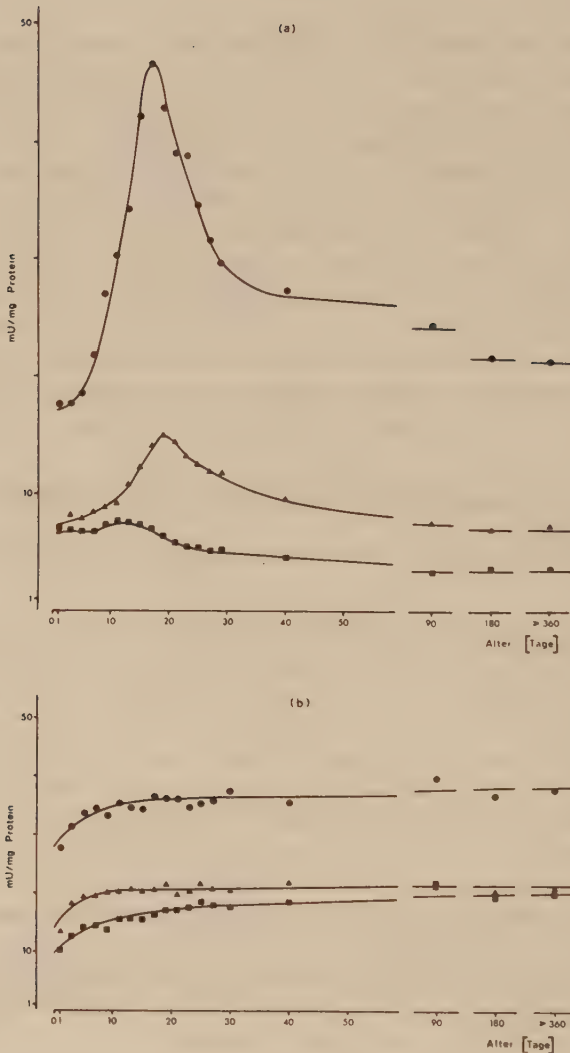


Abb. 23 Altersabhängige Veränderungen der Aktivitäten der Arylsulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und sauren Phosphatase des Gehirns und der Niere während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie der Ratte

Die Gesamtaktivitäten der drei sauren Hydrolasen wurden in 2 %-igen Homogenaten wie unter Material und Methoden beschrieben bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittel der Ergebnisse aus wenigstens sechs unter-

hängigkeit vom Alter der Tiere wieder. Alle drei Enzyme ließen unterschiedliche Veränderungen in ihrer spezifischen Aktivität während der postnatalen Organentwicklung erkennen. Die Maxima der Aktivität der Sulfatase und β -N-Acetylglucosaminidase liegen um den 17. bzw. 20. Tag post partum. Die Sulfatase weist im Vergleich zur β -N-Acetylglucosaminidase einen steileren Anstieg, eine größere prozentuale Zunahme und, nach Erreichen des Maximums, einen schnelleren Abfall der Aktivität auf. Im erwachsenen Tier besitzen beide Enzyme eine etwas höhere spezifische Aktivität als kurz nach der Geburt. Unterschiedlich dazu verläuft der Entwicklungsgang der Aktivität der sauren Phosphatase. Nach geringem Anstieg wird ein sehr flaches Maximum um den 12. Tag erreicht, wonach die Aktivität etwas stärker wieder abfällt. Die spezifische Aktivität des Enzyms ist im Gehirn neugeborener Ratten etwa doppelt so hoch wie im Gehirn adulter Tiere.

In Abb. 23b sind die spezifischen Aktivitäten der drei Enzyme der Niere in Abhängigkeit vom Alter wiedergegeben, die, abgesehen von einem leichten Anstieg in den ersten fünf Tagen nach der Geburt, keine dem Gehirn vergleichbaren Veränderungen aufwiesen.

Durch den Nachweis der Additivität der Enzymaktivitäten von Gewebsextrakten verschieden alter Tiere konnte ausgeschlossen werden, daß durch das Auftreten von unphysiologischen Inhibitoren und/oder Aktivatoren der Arylsulfatase der oben geschilderte postnatale Entwicklungsgang vorgetäuscht oder beeinflusst wird.

Durch Auftrennung der Sulfatasen mittels isoelektrischer Fokussierung konnte gezeigt werden, daß beide Formen bereits bei neugeborenen Tieren, und zwar in etwa dem gleichen Verhältnis wie bei adulten, vorhanden sind. Saure und basische Form der Sulfatase im Rattengehirn lassen jedoch einen etwas unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsgang erkennen, wie durch Bestimmung des prozentualen Anteils beider Formen an der Gesamtaktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 24a). Der Anteil der sauren Form durchläuft zwischen dem 13. und 15. Tag post partum ein flaches Minimum und stellt sich nach dem 25. Tag auf einen relativ konstanten Wert ein. Demnach ist die Zunahme der sauren Form während der ersten 13 bis 15 Lebenstage etwas geringer als die Zunahme der basischen Form und sie erreicht ihr Maximum um wenige Tage später als letztere. Für das Vorhandensein von zwei Maxima der basischen Form während der postnatalen

suchten Organen. Arylsulfatase (saure und basische Form) (●); β -N-Acetylglucosaminidase (▲); Saure Phosphatase (■).
(a) Gehirn; (b) Niere.

Entwicklung, wie es vor kurzem berichtet wurde (43), konnten keine Hinweise gefunden werden.

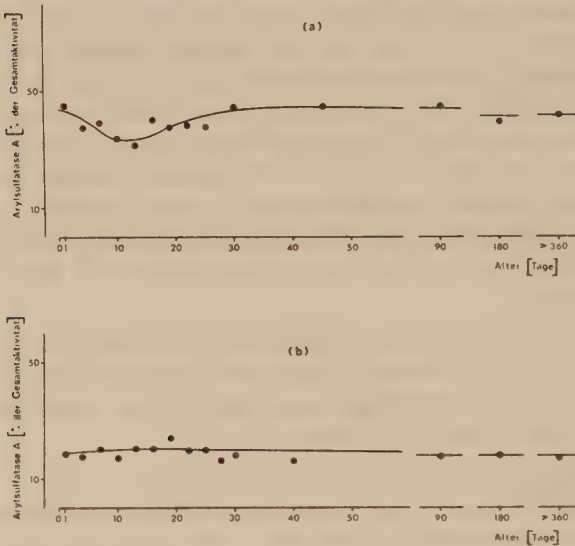


Abb. 24 Verhältnis von saurer und basischer Form der Sulfatase des Gehirns und der Niere während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie der Ratte

Das Verhältnis der beiden Formen der Sulfatase wurde nach Auftrennung mittels isoelektrischer Fokussierung nach der Methode von Vesterberg und Svensson (141) durch Summation der Einzelextinktionen der Fraktionen ermittelt (Abs. 4.5.). Die angegebenen Werte stellen das Mittel aus wenigstens sechs Bestimmungen dar.

(a) Gehirn; (b) Niere.

Das Verhältnis der beiden Formen der Sulfatase der Niere (Abb. 24b) erwies sich in dem untersuchten Zeitabschnitt als annähernd konstant.

2.4.2. Postnatale Veränderungen der intrazellulären Verteilung der Sulfatasen im Rattengehirn

Die Hauptmenge der untersuchten sauren Hydrolasen, 82 - 97 % der Gesamtaktivität, erwies sich als partikelgebunden (Abb. 19 - 21), d.h., es konnte eine lysosomale Lokalisation der Enzyme unabhängig vom Alter

der Tiere wahrscheinlich gemacht werden (Abs. 2.3.1.). Über signifikante Veränderungen der subzellulären Verteilung lassen sich keine Aussagen machen, da einerseits die Methode eine große Schwankungsbreite besitzt (77) und andererseits das Gehirn in dem untersuchten Zeitraum drastischen strukturellen Veränderungen unterworfen ist, was gleichbedeutend ist mit einer fortlaufenden Veränderung des Untersuchungsobjektes.

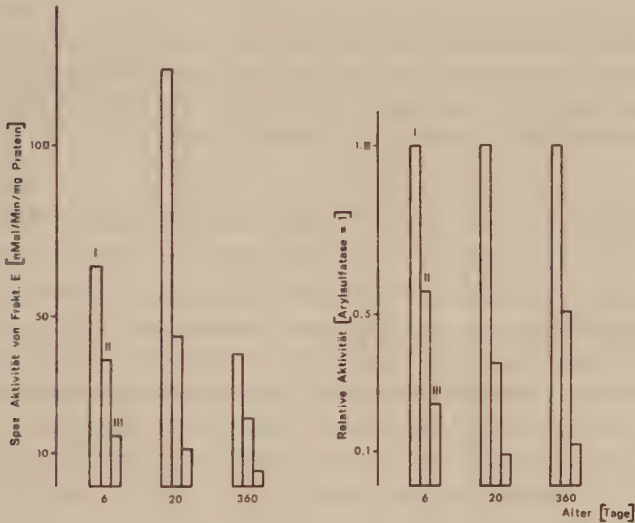


Abb. 25 Postnatale Veränderungen der Aktivitäten der Arylsulfatase, β-N-Acetylglucosaminidase und sauren Phosphatase einer lysosomenangereicherten Fraktion aus Rattengehirn

Fraktion E wurde, wie unter Abs. 4.10. beschrieben, durch Auftrennung eines Gewebshomogenats mittels Differential- und isopyknischer Zentrifugation gewonnen. Im linken Teil der Abbildung sind die Aktivitäten der sauren Hydrolasen bezogen auf Protein, im rechten Teil bezogen auf die Arylsulfatase-Aktivität dargestellt. I Arylsulfatase; II β-N-Acetylglucosaminidase; III saure Phosphatase.

Wie in Abb. 25 am Beispiel von drei verschieden alten Tieren gezeigt, spiegelt sich der im Gesamtgehirn gefundene Entwicklungsgang der Aktivitäten der drei sauren Hydrolasen in den spezifischen Aktivitäten einer lysosomenangereicherten Fraktion (Fraktion E, vgl. Abs. 2.3.1.) wider. Die größere prozentuale Zunahme der Sulfatase im Vergleich zu den anderen Enzymen während der ersten 20 Tage post partum kommt auch in den Lysosomen zum Ausdruck, betrachtet man die relativen Enzymaktivitäten

dieser Fraktion: β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase, bezogen auf die Sulfatase, durchlaufen in dieser Zeit ein relatives Minimum. Beide Formen der Sulfatase, saure und basische, ließen sich in den Lysosomen nachweisen. Unterschiede im Vergleich zu dem in Abs. 2.4.1. beschriebenen Entwicklungsgang beider Formen konnten nach Bestimmung ihres Anteils an der Gesamtaktivität, soweit geprüft, nicht erkannt werden.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (17) ließ sich auch mit der hier verwendeten Methode zeigen, daß, selbst bei schonender Homogenisation (Abs. 4.10.), der Anteil der sauren Hydrolasen im Cytosol (Fraktion S) mit zunehmendem Alter zunimmt, was auf eine größerwerdende Fragilität (eines Teils) der Lysosomen hinzudeuten scheint.

2.4.3. Postnatale Veränderungen der Eigenschaften der Sulfatase der Ratte

Die Eigenschaften der sauren Form der Sulfatase wurde an Enzympräparaten aus Gehirngewebe fünf verschiedener Altersgruppen (2, 8, 17, 26 und >360 Tage) geprüft. Keine der in Abs. 2.2. beschriebenen physikalischen und katalytischen Eigenschaften ließen eine Altersabhängigkeit erkennen. Das Verhältnis von Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Aktivität der sauren Form der Sulfatase erwies sich als konstant und bewegte sich bei Bestimmung unter optimalen Bedingungen für beide Substrate, im Falle der Cerebrosidsulfatase in Anwesenheit von Natriumtaurodesoxcholat, um 50 : 1. Dies bedeutet, daß der in Abb. 23a wiedergegebene postnatale Entwicklungsgang der Arylsulfatase-Aktivität, unter Berücksichtigung des zu Abb. 24a Gesagten, dem Entwicklungsgang der Cerebrosidsulfatase-Aktivität unter den hier verwendeten in vitro-Bedingungen entspricht. Die in vivo-Aktivität der Cerebrosidsulfatase wird jedoch einerseits durch die Ionenstärke der Mikroumgebung des Enzymmoleküls, andererseits durch die, möglicherweise auch eine Altersabhängigkeit aufweisende, Konzentration des von Mehl und Jatzkewitz (90) nachgewiesenen, physiologischen Aktivators der Cerebrosidsulfatase mitbestimmt. Eine Klärung dieses, auch unter dem Gesichtspunkt der Regulation der Enzymaktivität wichtigen Zusammenhangs muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

3. DISKUSSION

In Übereinstimmung mit einer Reihe früherer Befunde (46, 38, 47) konnten in den Geweben aller hier untersuchten Avertebraten Enzyme mit Arylsulfatase-Aktivität nachgewiesen werden. Darüberhinaus gelang hier, nach früheren erfolglosen (90) und nicht zweifellosen (48) Versuchen, auch in dieser Tiergruppe der Nachweis von Enzymen mit Cerebrosidsulfatase-Aktivität. Die entsprechenden Sulfatasen der Vertebraten sind bereits mehrfach beschrieben und untersucht worden (88, 90, 104, 108, 64, 44), wobei die vorliegenden Ergebnisse im Rahmen dieser Untersuchung mit Hilfe der Sulfatasen aus Rattengehirn bestätigt und zum Teil erweitert werden konnten.

Die Anreicherung der Sulfatasen erfolgte in Anlehnung an bereits beschriebene Verfahren (94, 14), die in geeigneter Weise modifiziert wurden. Die gesamte Aufarbeitung erfolgte in Anwesenheit von Triton X-100, da dieses Detergenz einen stabilisierenden Einfluß auf die Sulfatasen ausübt (L.M. Dziasloszynski, persönliche Mitteilung) und so die Verluste an Enzymaktivität während der Aufarbeitung vermindert. Die Sulfatasen der Avertebraten wie der Vertebraten ließen sich mit Puffer leicht aus den Geweben extrahieren und in Lösung bringen und weiter mit den üblichen Methoden der Proteinfractionierung, Fällung mit organischen Lösungsmitteln und Salzen, isoelektrischer Fokussierung, Gelchromatographie und Membranfiltration, auftrennen und reinigen. Die Enzyme konnten 50- bis 1000-fach, in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe, angereichert werden.

Im Rahmen dieser vergleichenden Untersuchung war es arbeitstechnisch nicht möglich, die Enzyme maximal zu reinigen; sie waren daher noch mit einer Reihe von Fremdproteinen kontaminiert. Es war somit nicht mit Sicherheit möglich, Arylsulfatase-Aktivität und Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatasen der Avertebraten auf die Wirkung eines Enzyms zurückzuführen, was für die Sulfatasen der Vertebraten in wenigstens zwei Fällen verifiziert werden konnte (75, 130). Hinweise für eine Identität beider Aktivitäten ergaben sich jedoch auf Grund einer Reihe gemeinsamer Eigenschaften physikalisch-chemischer Art. Beide Enzymaktivitäten einer Species liessen sich bei gleicher Konzentration mit Aceton bzw. Ammoniumsulfat fällen

(Abs. 2.1.), besaßen identische isoelektrische Punkte (Abs. 2.2.1.1.), wiesen die gleiche Molekulargewichtsverteilung auf (Abs. 2.2.1.2.) und zeigten eine praktisch identische Thermostabilität (Abs. 2.2.1.3.).

Darüberhinaus erstreckten sich die Ähnlichkeiten auch auf die Eigenschaften der katalytischen Reaktion. Beide Aktivitäten reagierten vergleichbar auf Änderung des pH-Wertes (Abs. 2.2.3.3.), gehorchten der Michaelis-Menten-Kinetik, wiesen ähnliche Michaelis-Konstanten auf (Abs. 2.2.3.4.) und zeigten die gleiche Reaktion gegenüber Inhibitoren (Abs. 2.2.3.5.). Die Inkubation mit beiden Substraten ergab Inhibition sowohl der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Nitrocatecholsulfat als auch der Arylsulfatase-Aktivität durch Cerebrosidsulfat. Hinzu kommt, daß einige der genannten Eigenschaften speciesabhängige Unterschiede erkennen ließen, innerhalb einer Species jedoch übereinstimmten.

Darüberhinaus konnten einige Eigenschaften der sauren Form der Sulfatase der Avertebraten aufgezeigt werden, die auch von den entsprechenden Sulfatasen der Vertebraten bekannt sind. Unphysiologische Aktivatoren wie Natriumtaurodesoxycholat, nicht hingegen Triton X-100, aktivierte die Cerebrosidsulfatase-Aktivität (64, 75), obwohl der Nachweis erbracht werden konnte, daß die Enzyme auch in Abwesenheit dieser unter geeigneten Bedingungen beträchtliche Cerebrosidsulfatase-Aktivität aufwiesen (Abs. 2.2.3.1.). Hohe wie sehr niedrige Ionenstärken des Inkubationsmediums wirkten dabei inhibierend (130). Es stellte sich überdies heraus, daß der von Mehl und Jatzkewitz (88) gefundene und von Jatzkewitz und Stinshoff (74) in Geweben von Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie nachgewiesene physiologische Aktivator der Cerebrosidsulfatase bei Sulfatasen aus Avertebraten ebenfalls als Aktivator wirksam war (92).

Diese Reihe von Indizien unterstützt die Annahme, daß die Arylsulfatase- und die Cerebrosidsulfatase-Reaktion auch in dieser Tiergruppe vom gleichen Enzymmolekül katalysiert wird, wenn diese Annahme damit auch nicht bewiesen werden konnte. Es bleibt jedoch weiterhin zu klären, ob Cerebrosidsulfat auch das physiologische Substrat der Sulfatase der Avertebraten darstellt, da bislang nicht gesichert ist, ob dieses komplexe Lipid hier als natürlicher Baustein anzutreffen ist (110, 79).

Der Befund, daß die Sulfatasen fast aller untersuchten Species in Form roher Präparate mit Hilfe der Elektrofokussierung in mindestens zwei Enzymfraktionen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten aufgetrennt werden konnten (Abs. 2.2.1.1.), läßt auf das Vorkommen multipler Enzymformen schließen. Ausnahmen waren die Gastropoden *Patella vulgata* und *Helix pomatia*, die neben einer Enzymfraktion mit einem isoelektrischen Punkt

im sauren pH-Bereich nur Spuren einer basischen Form erkennen ließen. Das isoelektrische Verhalten beider Formen variierte zwar mit der untersuchten Tierart, die isoelektrischen Punkte der beiden Formen der Sulfatase, insbesondere der sauren Form, erwiesen sich als verhältnismäßig konservatives Merkmal mit nur geringen Schwankungen. Nach Fokussierung roher Extrakte und angereicherter Enzyme wurden qualitativ gleiche Enzymmuster erhalten. Dieser Befund legt die Annahme nahe, daß den multiplen Enzymformen das gleiche scheinbare Molekulargewicht zukommt. Die starke Inhibierung der Arylsulfatase- wie der Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatasen durch Sulfat, Sulfit und Phosphat (Tab. 6) erlaubt ihre Klassifizierung als Sulfatasen des Typs 2 (38, 97). Die scheinbaren kinetischen Eigenschaften der beiden Formen, gemessen mit Nitrocatecholsulfat als Substrat, unterschieden sich, soweit geprüft, nur geringfügig.

Bei allen untersuchten Tieren war die Cerebrosidsulfatase-Aktivität mit der sauren Form der Sulfatase assoziiert. In den Fällen, in denen eine klare Trennung zwischen den beiden Formen der Sulfatase erzielt wurde, z. B. bei *Lumbricus terrestris* und *Microcosmus sulcatus*, konnten auch Hinweise für eine Cerebrosidsulfatase-Aktivität der basischen Form gefunden werden. Somit scheinen beide Enzymformen einer Species auch bezüglich der Cerebrosidsulfatase-Aktivität isodynamisch zu sein und können daher gemäß der operationalen Definition von Wieme (149) als multiple Formen angesprochen werden. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß auch eine geringe Cerebrosidsulfatase-Aktivität der basischen Form der Sulfatase aus Säugergewebe (menschliche Leber) nachgewiesen werden konnte (64). Überdies ähnelt das nach Fokussierung erhaltene Enzymmuster von *Microcosmus sulcatus* dem aus Säugergewebe, in Übereinstimmung mit der systematischen Stellung dieser Species.

Über die Natur der Multiplizität (69) der hier untersuchten Enzyme kann mit Hilfe der vorgelegten Befunde keine Aussage gemacht werden. Die Glykoproteinnatur, die für die Sulfatasen der Avertebraten nachgewiesen werden konnte (Abs. 2.2.1.4.), bietet vermutlich nur eine Erklärung der Mikroheterogenität, die einzelne Formen der Sulfatasen aufweisen. Kürzlich konnten Bleszynski und Roy (15) an hochgereinigten Sulfatasen aus Rindergewebe zeigen, daß beiden Enzymformen dieser Species eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung zukommt, was auf einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung, wenigstens in der Gruppe der Vertebraten, hindeutet (124, 125) und damit die Möglichkeit, daß es sich um genetisch unabhängige Proteine handelt, ausgeschlossen scheint.

Ein Einblick in einen möglichen Zusammenhang der Sulfatasen verschiedener

Species auf molekularer Ebene wird auch durch die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde ermöglicht. Die Molekulargewichtsbestimmung aller untersuchten Sulfatasen ergab einheitlich scheinbare Molekulargewichte von 60 - 70000 und/oder Vielfache davon, nämlich 110 - 130000, 220 - 240000 und >400000 (Tab. 3). Unterschiede zeigten sich nur in der Reaktion der Sulfatasen auf die verwendeten Bedingungen bei der Bestimmung dieses Parameters (Abs. 2.2.1.2.). Diesbezüglich ließen sich drei Gruppen von Enzymen unterscheiden. (a) Sulfatasen, die stabile Monomere (MG 60 - 70000) und/oder Dimere (MG 110 - 130000; höhere Molekulargewichte wurden in dieser Gruppe nicht gefunden) aufwiesen (Tab. 3a). (b) Sulfatasen, die auf Grund geringer Ionenstärke des Mediums und/oder geringer Enzym(Protein)-Konzentration (langsam) in niedermolekulare Formen aufspalteten, jedoch unter umgekehrten Bedingungen, bei hoher Ionenstärke des Milieus, keine nachweisbare Oligomerisierung erkennen ließen (Tab. 3b). Ein deutlicher Einfluß des pH-Wertes auf die Umwandlung konnte nicht nachgewiesen werden. (c) Sulfatasen, die auf niedrigen bzw. hohen pH-Wert des Milieus mit Oligomerisierung bzw. mit Monomerisierung reagierten, wobei zugleich ein Einfluß der Ionenstärke des Puffers und/oder der Enzym(Protein)-Konzentration zu beobachten war (Tab. 3c).

Als Ursache für die Oligo- bzw. Monomerisierung der sauren Form der Sulfatase aus Rindergewebe in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums wurden hydrophobe Wechselwirkungen in Konkurrenz mit den abstoßenden Kräften hoher Nettoladungen des Enzymmoleküls verantwortlich gemacht (95, 96). In der Nähe des isoelektrischen Punktes, zwischen pH 4,5 und 5,5, ist die negative Nettoladung der Sulfatase klein und hydrophobe Wechselwirkungen überwiegen die elektrostatische Abstoßung, was zur Bildung von Oligomeren des Enzyms führt, wogegen bei einem pH-Wert von 7,5 die Monomeren durch eine hohe Nettoladung der Moleküle getrennt werden. Dieses Modell dürfte für die Gruppe (c) der hier beschriebenen Sulfatasen Gültigkeit besitzen, wenngleich es nicht bewiesen werden konnte. Demgegenüber scheinen die Sulfatasen der Gruppe (b) auch bei hohem pH-Wert eine geringere Nettoladung zu besitzen, was die Stabilität der oligomeren Formen über den gesamten getesteten pH-Bereich erklären würde. Bei niedriger Enzym(Protein)-Konzentration dissoziieren die höhermolekularen Enzymformen unter Bildung von Monomeren, wie es auch für das Enzym aus Rindergewebe beschrieben wurde (95). Für die Stabilität der Dimerformen der Sulfatasen der Gruppe (a) sind möglicherweise Disulfidbrücken- und/oder Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich, was jedoch einer weiteren Klärung vorbehalten bleiben muß.

Obwohl sich das Verhalten der Enzyme somit als ausgesprochen komplex dar-

stellte, konnte als grundlegende, enzymatisch aktive Untereinheit aller untersuchten Sulfatasen ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 60 - 70000 wahrscheinlich gemacht werden, unabhängig von der systematischen Stellung der jeweiligen Tierart¹⁾.

Sulfatasen mit der Eigenschaft, Oligomerformen zu bilden, sind, wie hier gezeigt werden konnte, offensichtlich mehrmals und unabhängig voneinander im Laufe der Phylogenie entstanden. Unterstützt wird diese Feststellung durch die Beobachtung, daß auch die saure Form der Sulfatase eines Vertreters der Vertebraten, des roten Känguruhs (*Megaleia rufa*), unter allen untersuchten Bedingungen nur in einer Form mit einem Molekulargewicht von 100000 vorlag (116); die bisher untersuchten Enzyme der Vertebraten ließen im Gegensatz dazu Oligomerisierung erkennen.

Ob und inwieweit die Potenz der Sulfatasen, Oligomerformen zu bilden, in Zusammenhang steht mit der Regulation der Enzymaktivität innerhalb der Zelle, etwa über eine Änderung der Ionenstärke bzw. des pH-Wertes der Mikroumgebung des Enzymmoleküls, kann mit Hilfe der hier erhobenen Befunde nicht geklärt werden. Als enzymatisch aktiv, sowohl gegenüber Nitrocatecholsulfat als auch Cerebrosidsulfat, erwiesen sich die Monomer- wie die stabilen Oligomerformen, z.B. die Dimerformen von *Patella vulgata* und *Helix pomatia* (Tab. 3a). In vitro, bei "katalytischen" Konzentrationen der Enzyme, scheinen die monomeren Formen vorzuherrschen. Ungeklärt muß jedoch bleiben, welche Enzymspecies in vivo katalytisch wirksam ist.

Die hier vorgelegten physikalisch-chemischen Eigenschaften der sauren Form der Sulfatasen der Avertebraten und Vertebraten, gleiches Molekulargewicht der kleinsten, enzymatisch aktiven Untereinheit mit sehr ähnlichen isoelektrischen Punkten im Verein mit der Glykoproteinnatur dieser Enzyme deuten Gemeinsamkeiten auf molekularer Ebene an und legen somit die Vermutung eines gemeinsamen phylogenetischen Ursprungs der Sulfatasen nahe.

Jedoch nicht nur in struktureller, sondern auch funktioneller Hinsicht lassen sich Gemeinsamkeiten der sauren Formen der Sulfatasen aufzeigen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen, die mit hochgereinigter Sulfatase aus Säugergewebe erhalten wurden (75, 130), wiesen die sauren Formen der Sul-

¹⁾ Für die monomere saure Form der Sulfatase der Vertebraten sind bisher Molekulargewichte von 100 - 130000 angegeben worden (95, 130). Der in dieser Arbeit vorgelegte Befund, daß das Enzym aus Rattengehirn teilweise in enzymatisch aktive Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 60 - 70000 aufspaltet (vgl. Tab. 3c), wurde in der Zwischenzeit von anderer Seite bestätigt (R.L. Stevens, A.L. Fluharty, M.H. Skokut und H. Kihara, J. Biol. Chem. 250, 2495 - 2501 (1975)).

fatase der Avertebraten in Abwesenheit von Detergenzien bei geeigneter Ionenstärke des Inkubationsmediums eine hohe Cerebrosidsulfatase-Aktivität auf (Abs. 2.2.3.1.). Die Enzymaktivität durchläuft in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration ein scharfes Maximum (Abb. 7), hohe wie niedrige Konzentration wirken dabei gleichermaßen inhibierend. Darüberhinaus zeigten auch die hier untersuchten sauren Formen der Sulfatase eine Reaktion gegenüber unphysiologischen und physiologischen Aktivatoren. Rohes Natriumtaurodesoxychololat als unphysiologischer Aktivator erhöhte die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der sauren Form der Sulfatase, nicht jedoch deren Arylsulfatase-Aktivität. Der Mechanismus der aktivierenden Wirkung dieses Detergenz ist bislang ungeklärt. Es konnte bisher nur gezeigt werden, daß Substrat und Detergenz Mischmicellen bilden (50, 75). Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität durchläuft in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration ein Maximum, welches seine Lage nicht wesentlich ändert, variiert man das Verhältnis von Lipidsubstrat und Detergenz, was eine stöchiometrische Beziehung beider in den Mischmicellen als Voraussetzung für einen Angriff des Enzyms unwahrscheinlich erscheinen läßt. Die Anwesenheit des Detergenz scheint andererseits auch für die Bindung des Lipidsubstrates an das Enzym nicht notwendig zu sein, da eine Hemmung der Arylsulfatase-Aktivität der sauren Form der Sulfatase durch Cerebrosidsulfat auch in Abwesenheit von Taurodesoxychololat nachgewiesen werden konnte.

Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität ließ auch in Anwesenheit von Taurodesoxychololat eine Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums erkennen, wobei jedoch hier das Aktivitätsmaximum bei höheren Pufferkonzentrationen lag, verglichen mit dem Aktivitätsprofil, das in Abwesenheit des Detergenz erhalten wurde. Die Spaltung des chromogenen Substrates Nitrocatecholsulfat wurde von der Ionenstärke des Inkubationsmediums wie durch den Zusatz von Taurodesoxychololat nur gering beeinflusst; letzterer führte zur teilweisen Inhibierung der Enzymaktivität.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß das Detergenz ebenso wie das Ionenmilieu den physikalisch-chemischen Zustand sowohl des Lipidsubstrates als auch des Enzymproteins beeinflussen und dadurch die Enzymaktivität. Die Untersuchung des Einflusses der Ionenstärke auf die Aktivität bakterieller (*Vibrio cholerae*) Sialidase mit Gangliosiden als Substrat führte zu vergleichbaren Ergebnissen (82).

Nicht nur unphysiologische Aktivatoren, sondern auch der von Mehl und Jatzkewitz (88, 90) gefundene physiologische Aktivator übte auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der sauren Form der Sulfatase unabhängig von

der untersuchten Tierspecies eine stimulierende Wirkung aus (92). Über das Vorkommen eines derartigen Aktivators bei Avertebraten herrscht noch Unklarheit.

Die scheinbaren kinetischen Parameter, optimaler pH-Wert und Michaelis-Konstante, der Arylsulfatase- und Cerebrosidsulfatase-Reaktion erwiesen sich zwar als speciesabhängig, zeigten jedoch nur eine geringe Schwankungsbreite. Die Unterschiede, die für beide Substrate für das Enzym einer Species gefunden wurden, erwiesen sich als qualitativ gleichartig den Unterschieden, die auch mit hochgereinigten Sulfatasen erhalten wurden (75) und lassen sich vermutlich auf die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen zurückführen. Nitrocatechol ist ein kleines, in wässrigem Medium molekulardispers lösliches Molekül, Cerebrosidsulfat dagegen ein größeres, in wässrigem Medium micellardispers lösliches, amphiphiles Lipid (1, 123), dessen kritische micellare Konzentration wahrscheinlich sehr klein ist, wie in Analogie zu vergleichbaren Lipiden angenommen werden kann (101). Die Sulfatgruppen beider Verbindungen liegen im physiologisch bedeutsamen pH-Bereich vollständig dissoziiert vor (109). Da die Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht, liegt die Vermutung nahe, daß das Enzym das Lipidsubstrat nur in seiner micellaren Form spaltet (53), in An- wie in Abwesenheit von Detergenzien.

Trotz der offensichtlichen Verwandtschaft der sauren Formen der Sulfatasen der Avertebraten und Vertebraten ließ sich jedoch ein wesentlicher Unterschied in den Eigenschaften der katalytischen Reaktion erkennen. Während die Aktivität der sauren Form der Sulfatase der Avertebraten sowohl gegenüber Nitrocatecholsulfat als auch Cerebrosidsulfat als Substraten sich direkt proportional zur Inkubationszeit erwies, zeigte die Zeit-Umsatz-Beziehung des entsprechenden Enzyms der Vertebraten dagegen keine Proportionalität (Abs. 2.2.3.2.). Diese Anomalie ist für das Enzym aus Säugergewebe schon mehrfach beschrieben worden (9, 10, 97) und es konnte nachgewiesen werden, daß der von Stinshoff (129) aufgestellte mathematische Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Substrat-Umsatz auch für das hier untersuchte Enzym gilt. Die in dieser Arbeit berichteten Beobachtungen entsprechen denen von Stinshoff (130) und bedürfen daher keiner weiteren Diskussion. Ob dieser "Anomalie" eine physiologische Bedeutung zukommt, ist bislang ungeklärt. Zwischen der Fähigkeit der Sulfatasen, Cerebrosidsulfat zu spalten, und dem anomalen kinetischen Verhalten besteht jedoch kein Zusammenhang.

Die sehr ähnlichen Eigenschaften der katalytischen Reaktion der sauren

Form der Sulfatasen der Avertebraten und der Vertebraten, wie sie oben dargelegt wurden, deuten auf eine strukturelle Verwandtschaft ihrer aktiven Zentren hin. Sowohl die vorgelegten physikalisch-chemischen als auch katalytischen Eigenschaften scheinen eine konvergente Entwicklung der sauren Formen der Sulfatasen innerhalb des Tierreichs auszuschließen, legen also eher die Vermutung nahe, daß es sich um homologe Enzyme handelt. Weitere Hinweise sollten von einer immunologischen Untersuchung der Sulfatasen zu erwarten sein.

Arylsulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase gehören zu den sauren Hydrolasen, die bei Vertebraten in einer definierten Klasse cytoplasmatischer Partikel, den Lysosomen, lokalisiert sind (42). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen am Rattengehirn erwies sich die Hauptmenge, 82 - 97 % der Gesamtaktivität, der Sulfatasen als sedimentierbar, d.h. partikelgebunden. Die größte relative spezifische Aktivität (RSA) aller drei getesteten Enzyme wurde in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (77) nach Gleichgewichts-Ultrazentrifugation über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten in der dichtesten Fraktion gefunden (Abs. 2.3.1.). Durch Auftrennung der beiden Formen der Sulfatase mittels isoelektrischer Fokussierung konnte nachgewiesen werden, daß bei den Formen die gleiche intrazelluläre Lokalisation zukommt.

Die relativen spezifischen Aktivitäten und damit die Verteilung der drei sauren Hydrolasen variierte beträchtlich innerhalb der Primärfractionen wie der Sekundärfractionen. Dieser Befund kann nur damit erklärt werden daß die Lysosomenpopulation des Gesamtgehirns heterogen ist sowohl bezüglich der Dichte als auch der Größe und vermutlich auch der Enzymausstattung der Lysosomen (122), wofür auch Hinweise auf Grund von Untersuchungen an anderen Organen vorliegen (49). Signifikante Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Hydrolasen in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Tiere konnten nicht nachgewiesen werden.

Über die intrazelluläre Lokalisation der sauren Hydrolasen bei Avertebraten herrscht noch weitgehend Unklarheit (32, 33), obwohl diese Klasse von Enzymen auch bei Avertebraten weitverbreitet ist (33), wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abs. 2.3.2., Tab. 7).

Teilangereicherte Sulfatasepräparate aus den Geweben höherer und niederer Tiere lassen einige gemeinsame Eigenschaften erkennen. Sie sind gleichermaßen kontaminiert mit anderen sauren Hydrolasen, z.B. saure Phosphatase und β -N-Acetylglucosaminidase, und beide Präparate bauen Cerebrosidsulfat schrittweise nicht nur zu Cerebrosid, sondern weiter zu Ceramid ab (145), auf Grund der Anwesenheit einer Galactosylceramid- β -D-galacto-

sidase. Da einerseits Arylsulfatase und saure Phosphatase bei Vertebraten als Marker-Enzyme für Lysosomen betrachtet werden und da andererseits für Vertebraten wie für Avertebraten der gleiche, bei Vertebraten durch lysosomale Enzyme katalysierte, Abbaupfad eines komplexen Lipids, Cerebrosidsulfat, nachgewiesen werden konnte, kann vermutet werden, daß subzelluläre Partikel, vergleichbar den Lysosomen der Vertebraten, auch bei Avertebraten anzutreffen sind.

Cytochemische Beobachtungen (28, 33) unterstützen diese Vermutung ebenso wie der hier erbrachte Nachweis der Glykoproteinnatur der Sulfatasen der Avertebraten (Abs. 2.2.1.4.).

Eine gemeinsame Eigenschaft hinsichtlich der chemischen Struktur lysosomaler Enzyme ist deren Glykoproteinnatur. So konnte eine ganze Reihe dieser Enzyme, z.B. die saure Phosphatase, β -N-Acetylglucosaminidase, β -Glucuronidase, Hyaluronidase, Cathepsin C und Cathepsin D, als Glykoproteine erkannt werden (7). Die Biosynthese des Kohlenhydratanteils der Glykoproteine erfolgt, nach Fertigstellung des Proteingrundgerüsts, innerhalb der Cisternen des rauen und glatten endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Bereich. Von dort werden die Glykoproteine, vom übrigen Cytoplasma durch eine Membran getrennt, als Vesikel aus der Zelle transportiert, im Falle der Lysosomen verzögert, nach Verschmelzen mit endocytischen Vakuolen. Im Gegensatz zu diesen "extrazellulären" Proteinen der Lysosomen haben sich "intrazelluläre" Proteine nicht als Glykoproteine erwiesen (8). Nimmt man bei Avertebraten einen ähnlichen Syntheseweg wie den hier für Vertebraten geschilderten an, so wird nicht nur aus funktionellen, sondern auch aus strukturellen Gründen eine lysosomale Lokalisation der sauren Hydrolasen der Avertebraten wahrscheinlich.

Die zelluläre Proliferation und Differenzierung im Gehirn während der Ontogenie führt zu einer Veränderung sowohl der Konzentration verschiedener Substanzen als auch der Aktivität verschiedener Enzyme (76, 17, 6). So korreliert im Rattengehirn die Zunahme von Cerebrosidsulfat, subzellulär fast ausschließlich im Myelinmembransystem lokalisiert (80), mit der Differenzierung und Proliferation der Oligodendroglia-Membran unter Bildung des Myelins (146, 86, 66, 106), die Zunahme der Ganglioside, subzellulär hauptsächlich in den Membranen der Nervenendigungen und Mikrosomen lokalisiert (147, 80), mit der Bildung neuronaler Fortsätze und der Synapsen (134, 117, 136, 138).

Die Untersuchung der Altersabhängigkeit der sauren Hydrolasen des Gehirns, die Cerebrosidsulfat bzw. das Gangliosid G_{M2} (135), einen Vertreter dieser heterogenen Gruppe komplexer Lipide, abbauen, nämlich die saure Form der

Sulfatase und die β -N-Acetylglucosaminidase (119), ließ erkennen, daß im Zeitraum der höchsten Syntheserate der genannten Membranlipide auch die sie abbauenden Enzyme ihre höchste Syntheserate, gemessen als Zunahme der spezifischen Aktivität, erreichen (Abb. 23a). Im Vergleich dazu zeigt die altersabhängige Entwicklung der Aktivität der sauren Phosphatase einen anderen Verlauf. Einem sehr geringen Anstieg der spezifischen Aktivität kurz nach der Geburt folgt ein stetiger, geringer Abfall (Abb. 23a).

Die Erhöhung der spezifischen Aktivität der sauren Form der Sulfatase zwischen dem 10. und 20. Tag post partum darf auf eine Neusynthese des Enzyms zurückgeführt werden, da ausgeschlossen werden konnte, daß unphysiologische Aktivatoren oder Inhibitoren für die veränderte Sulfatase-Aktivität verantwortlich sind (Abs. 2.4.1.); entsprechendes gilt für die β -N-Acetylglucosaminidase.

Es erscheint zunächst unverständlich, daß in einem Zeitraum erhöhter Bausteinsynthese des Gehirns, die, wie oben angedeutet, Vorbedingung wesentlicher Wachstums- und Differenzierungsprozesse ist, zugleich auch die Synthese der katabolen Enzyme dieser Bausteine erhöht ist. Verständlich wird dieser Befund auch dann nicht, geht man von der statischen Vorstellung der unterschiedlichen intrazellulären Verteilung der genannten Lipide als Membranbausteine und der sauren Hydrolasen als Bestandteile der Lysosomen aus. So gesehen sind diese dem Angriff jener nicht direkt ausgesetzt, da die lysosomalen Enzyme erst aktiv werden, nachdem sich aus primären Lysosomen unter Verschmelzung mit endocytischen Vakuolen sekundäre Lysosomen gebildet haben (32, 33). Es ist daher zu vermuten, daß die Bedeutung der erhöhten Synthese der Hydrolasen sowohl in einem anderen funktionellen wie strukturellen Zusammenhang zu suchen ist.

Ausgehend von der Beobachtung, daß die Enzyme der Membranlipid- und Membranproteinsynthese an das endoplasmatische Reticulum gebunden sind (83, 26) und von der Vermutung, daß die gebildeten Membranbausteine am Synthesort in die Membran inkorporiert werden, ist von Morr  und Mitarbeitern eine Hypothese der Membranbiosynthese entwickelt worden (60). Darin wird angenommen, daß das endoplasmatische Reticulum der primäre Ort der Membranbiosynthese ist und die dort gebildeten Strukturen anschließend in den Golgi-Bereich transferiert werden. Eine wichtige Funktion des Golgi-Apparates wird nun darin gesehen, die dem endoplasmatischen Reticulum ähnlichen zu Plasma-Membran bzw. Kern-Membran ähnlichen Strukturen abzuwandeln, d.h., der Golgi-Bereich wird als der Ort der Membranumwandlung angesehen. Unterstützt wird diese, als sequentielle Transformationshypothese der Membranen bezeichnete, Vorstellung durch eine Reihe von Beobachtungen. Einer-

seits ließ sich elektronenmikroskopisch ein Gradient vom endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Bereich zur Kernmembran sowohl hinsichtlich der Dicke als auch des färberischen Verhaltens feststellen (60), andererseits konnte gezeigt werden, daß die chemische Zusammensetzung isolierter Golgi-Membranen, einschließlich des Enzymprofils, eine intermediäre Stellung zwischen der des endoplasmatischen Retikulums und der der Plasmamembran einnimmt (20). Darüberhinaus scheint neben dieser chemischen bzw. funktionellen Kontinuität der verschiedenen Membransysteme auch eine strukturelle Kontinuität sehr wahrscheinlich, wenn diese auch bisher für die Verbindung Golgi- und Plasmamembran nicht mit Eindeutigkeit gezeigt werden konnte (K.H. Blinzinger, persönliche Mitteilung).

Neben seiner Funktion im Zusammenhang mit der Membrantransformation ist der Golgi-Apparat auch beteiligt an der Biosynthese der lysosomalen Enzyme (8) und der Bildung der Lysosomen (32, 33). Nach der Synthese des Proteingrundgerüsts der sauren Hydrolasen am rauen endoplasmatischen Reticulum und deren Aufnahme in die Cisternen desselben erfolgt die schrittweise Synthese des Kohlenhydratanteils im glatten endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Bereich, von wo aus diese Enzyme auch, von einer Membran umgeben, als primäre Lysosomen freigesetzt werden.

Der Golgi-Apparat scheint somit eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zu erfüllen und damit im Kreuzungspunkt wesentlicher zellulärer Vorgänge zu stehen. Analog dazu darf angenommen werden, daß wenigstens einige saure Hydrolasen eine mehrfache, zeitlich wie räumlich getrennte, Funktion besitzen. Neben ihrer Aufgabe in den primären und sekundären Lysosomen könnte diesen Enzymen auch eine Aufgabe bei der Membrantransformation im Golgi-Bereich zukommen. So könnte die erhöhte Synthese der sauren Form der Sulfatase der Oligodendrogliazelle die Möglichkeit der Regulation der Cerebrosidsulfatinkorporation bei der gesteigerten Membransynthese während der Myelinisierung bieten; sinngemäß könnte dies auch für die β -N-Acetylglucosaminidase bezüglich der Membransynthese der Neuronen gelten. Dafür sprechen die enge räumliche Assoziation von Enzym und Substrat im Golgi-Bereich während der Biogenese der Hydrolasen und die Beobachtung, daß die Enzyme auch in Abwesenheit des Kohlenhydratanteils ihre enzymatische Aktivität besitzen (58) (vgl. Abs. 2.2.3.5.). In die gleiche Richtung weisen auch die verhältnismäßig kurze Halbwertszeit der Enzyme, wie aus Abb. 23a abgeschätzt werden kann, und der Befund, daß in der Niere, die zum Zeitpunkt der Geburt der Ratte weitgehend ausdifferenziert ist, also keine gesteigerte Membransynthese aufweist, keine dem Gehirn vergleichbare Altersabhängigkeit der Enzymaktivität erkennen läßt (Abb. 23b).

Ob und inwieweit der physiologische Aktivator der Cerebrosidsulfatase (73,

90) eine Rolle bei der Regulation der Membranbiosynthese spielt, muß offen bleiben, da sowohl die Altersabhängigkeit als auch die intrazelluläre Lokalisation bislang unbekannt sind. Auf Grund der hier vorgelegten Ergebnisse konnte nur deutlich gemacht werden, daß bei der Ratte die Aktivität der sauren Form der Arylsulfatase der Aktivität der Cerebrosidsulfatase proportional ist, unabhängig vom Alter der untersuchten Tiere (Abs. 2.4.3.).

Der Mechanismus der Induktion und die Ebene der Regulation der Enzymsynthese liegen noch vollkommen im Dunkeln. Vorläufige Untersuchungen an Fibroblasten (Mraz und Jatzkewitz, unveröffentlicht), die mit Cerebrosidsulfat inkubiert wurden und die dieses Lipid auch phagocytiert hatten, erbrachten keine Hinweise für eine erhöhte Synthese der Sulfatase. Damit läßt sich jedoch das Substrat des entsprechenden Enzyms als Induktor noch nicht mit Sicherheit ausschließen, da nach Phagocytose einer Substanz diese intrazellulär an anderer Stelle lokalisiert ist als die in vivo synthetisierte.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Tiere

Tethya aurantium PALLAS (Porifera), *Actinia equina* L. (Cnidaria), *Lima inflata* GMELIN, *Pecten jacobaeus* L. (Mollusca), *Maja squinado* RONDELET (Arthropoda), *Holothuria forskali* DELLE CHIAJE, *Marthasterias glacialis* L. (Echinodermata) und *Microcosmus sulcatus* COQUEBERT (Tunicata) wurden im Mittelmeer in der Nähe von Rovinj (Jugoslawien) gefangen und während des Transports mit Trockeneis gekühlt. *Lumbricus terrestris* L. (Annelida) und *Helix pomatia* L. (Mollusca) wurden in einer örtlichen Tierhandlung gekauft, *Blaberus spec.* SERVILLE (Arthropoda) war Tiermaterial aus dem Zoologischen Institut der Universität München. *Patella vulgata* L. und *Helix pomatia* L. (Mollusca) wurden als rohe Sulfatasepräparationen in Form eines Acetontrockenpulvers von der Fa. Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., USA) bezogen.

Weißer Laboratoriumsratten verschiedenen Alters (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, Inzuchtstamm) wurden von der GSF München/Neuherberg zur Verfügung gestellt. Die Ratten wurden durch Dekapitieren getötet, Gehirn und Nieren sofort entnommen und tiefgefroren.

Die Tiere, Gewebe und Trockenpulver wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2. Chemikalien

4.2.1. Reagenzien und Adsorbenzien

Triton X-100 pract., Tris(hydroxymethyl)aminomethan, N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin, N,N'-Methylenbisacrylamid, Coomassie Brilliant Blau und die Molekulargewichtsstandards für die Gelchromatographie wurden bei der Fa. Serva (Heidelberg), ein rohes Natriumtaurodesoxycholat-Präparat wurde von der Fa. Schuchardt (München), Concanavalin A von der Fa. Deutsche Pharmacia (Frankfurt) und Methyl- β -D-glucopyranosid von der Fa. Koch-

Light Lab. (Colnbrook, England) bezogen. Zur Gelchromatographie dienten Sephadex G-200 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt) und Biogel P-200 (Bio-Rad Laboratories, München). Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Ampholine Trägerampholyten der Fa. LKB Produkter AB (Bromma, Schweden) durchgeführt. Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt), als Adsorbens zur Säulenchromatographie wurde Florisil (Floridin Co., Pittsburgh, USA) verwendet. Tritiumgas wurde von der Fa. NEN Chemical GmbH (Dreieichenhain), [^3H]Toluol von der Fa. Packard Instruments (Frankfurt) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren Handelsprodukte des Reinheitsgrades p.a. der Fa. Merck (Darmstadt).

4.2.2. Substrate

Nitrocatecholsulfat (2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat) wurde von der Fa. Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., USA), p-Nitrophenyl- β -D-acetylglucosaminid und p-Nitrophenylphosphat wurden von der Fa. Koch-Light Lab. (Colnbrook, England) bezogen. Cerebrosidsulfat wurde, wie im Folgenden beschrieben, aus Rindergehirn isoliert und radioaktiv markiert.

Die weiße Substanz eines frischen Rindergehirns wurde mit Chloroform/Methanol (2:1, Vol./Vol.) extrahiert und anschließend einer Verteilung nach Folch et al. (45) unterworfen. Der so gewonnene vorgereinigte Lipidextrakt wurde nach der von Mehl und Jatzkewitz (87) angegebenen Methode durch Chromatographie an aktiviertem Florisil von den Phosphatiden befreit und durch eine weitere Chromatographie an entaktiviertem Florisil in Cholesterin, Cerebrosid (Kerasin und Cerebron) und Cerebrosidsulfat (Kerasin- und Cerebronsulfat) aufgetrennt. Die radioaktive Markierung des so isolierten Cerebrosidsulfats erfolgte durch katalytische Addition von Tritium an die Doppelbindungen des Fettsäure- und Sphingosinanteils des Moleküls. 50 mg Cerebrosidsulfat, aufgenommen in Benzol/Dimethylformamid (7:1, Vol./Vol.), wurden mit Tritiumgas (10 Ci) unter Verwendung von Platindioxid (0,2 g) als Katalysator nach einem von Sandhoff et al. (120) angegebenen und von Stinshoff (130) modifizierten Verfahren in einer von Wacker und Träger (142) beschriebenen Apparatur hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stdn. (40°C) wurde die Lösung filtriert, das Produkt im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und in Chloroform/Methanol (2:1, Vol./Vol.) wieder aufgenommen. Der zuletzt beschriebene Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die spezifische Radioaktivität einen konstanten Wert erreicht hatte. Die Reinigung des markierten Cerebrosid-

sulfats erfolgte wie oben angegeben durch zweimalige Chromatographie an entaktiviertem Florisil. Die spezifische Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Philips PW 4510, Eindhoven, Niederlande) zu 1,5 mCi/ μ Mol nach Snyder und Stephens (126) mit [3 H]Toluol als internem Standard bestimmt.

4.3. Enzymbestimmungsmethoden

4.3.1. Sulfatase

4.3.1.1. Aktivitätsbestimmung der Sulfatase mit Nitrocatecholsulfat (2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat, NCS) als Substrat (38)

Das Inkubationsgemisch enthielt, soweit nicht anders angegeben, 3 μ Mol (15 mM) Nitrocatecholsulfat, 0,05 mMol (0,25 M) Natriumacetat-Puffer und eine angemessene Menge Sulfatase in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml (pH 5,5). Die Inkubationsdauer betrug 5 - 30 Min. (37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 ml 1N Natronlauge gestoppt und die Konzentration des freigesetzten Nitrocatechols (NC) spektrophotometrisch (PMQ II-Spektrophotometer, Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Wellenlänge von 515 nm bestimmt ($\epsilon_{515 \text{ nm}}$ von Nitrocatecholat: 12400).

4.3.1.2. Aktivitätsbestimmung der Sulfatase mit [3 H]Cerebrosidsulfat ([3 H]CS) als Substrat

Der Inkubationsansatz enthielt, sofern nicht anders vermerkt, 60 nMol (0,6 mM) [3 H]Cerebrosidsulfat, 0,025 mMol (0,25 M) Natriumacetat-Puffer, 250 μ g (5 mM) rohes Natriumtaurodesoxycholat und eine geeignete Menge Sulfatase in einem Gesamtvolumen von 0,1 ml (pH 4,5 bzw. 5,8). Wurden die Inkubationen in Abwesenheit von Taurodesoxycholat durchgeführt, so wurde das Substrat vor Zugabe des Enzyms durch Ultraschall (10 Sek., 70 Watt Ausgangsleistung; Sonifier B12, Fa. Branson Instruments, Stanford, Connecticut, USA) in Puffer dispergiert (1). Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. - 5 Std. (37°C) wurde die Reaktion durch Auftragen aliquoter Teile (25 μ l) des Inkubationsgemisches auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) beendet.

Nicht umgesetztes Substrat ([3 H]Cerebrosidsulfat) und Abbauprodukte ([3 H]Cerebrosid und in einigen Fällen auch [3 H]Ceramid, vgl. Abs. 2.2.2.) wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch mit Chloroform/Methanol/Wasser (80:20:3, Vol./Vol./Vol.) als Laufmittel getrennt. Die Verteilung

der Radioaktivität auf der Platte wurde mit Hilfe eines Radiodünnschicht-scanners (Berthold, Wildbad) ausgemessen und als Kurve aufgezeichnet (vgl. Abb. 5). Der Umsatz an [^3H]Cerebrosidsulfat wurde aus dem Flächen-verhältnis der Radioaktivitätspeaks berechnet (13, 64).

4.3.1.3. Bestimmung der Parameter der Sulfatase-Reaktion

Die beiden oben beschriebenen Bestimmungsmethoden waren nicht für alle untersuchten Sulfatasen optimal. Sie wurden jedoch als Standardmethoden zur Verfolgung der Reinigung und Anreicherung der Enzyme und zur Bestimmung der Aktivitäten nach analytischer Gelchromatographie und Elektrofokussierung verwendet, wobei in einigen Fällen auch längere Inkubationszeiten in Kauf genommen werden mußten.

Die Bestimmungen der kinetischen Parameter der Sulfatase-Reaktion wurde unter optimalen Bedingungen durchgeführt, mit Ausnahme der [^3H]Cerebrosidsulfatkonzentration, da aus experimentellen Gründen nicht bei Substratsättigung gemessen werden konnte. Die pH-Wertänderung während der Inkubation war, wie durch Blindversuche ermittelt wurde, in keinem Falle größer als 0,05 Einheiten.

Die Beziehung zwischen Inkubationszeit und Umsatz an Substrat war für die Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatasen der Wirbellosen linear, nicht jedoch für die Arylsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte (vgl. Abs. 2.2.3.2.). Daher war die Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion im Falle des Rattenenzyms nicht durch Endpunktsbestimmung möglich.

Stinshoff (129) hat für die Zeit-Umsatz-Relation der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A aus menschlicher Leber die Beziehung

$$\frac{1}{u} = \frac{1}{v_0} \frac{1}{t} + \frac{1}{u_{\max}}$$

vorgeschlagen, wobei u den Umsatz (nMol NC), $u_{\max}$ den theoretischen maximalen Umsatz (nMol NC), t die Inkubationszeit (Min.) und v_0 die Anfangsgeschwindigkeit (nMol NC/Min.) der Reaktion bedeuten. Vorversuche ergaben, daß diese Beziehung auch für die Reaktion der sauren Form des Rattenenzyms gilt. Danach war es möglich, Anfangsgeschwindigkeit und maximalen Umsatz der Arylsulfatase-Reaktion graphisch zu bestimmen. Nach Kenntnis von v_0 und $u_{\max}$ läßt die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (Min.), d.h. die Zeit, in der die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion auf die Hälfte ihres Ausgangswertes abgefallen ist, sich nach der Beziehung

$$t_{1/2} = 0,414 \frac{u_{\max}}{v_0}$$

berechnen.

Auch die Zeit-Umsatz-Relation der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der sauren Form der Sulfatase der Ratte ist nicht linear, im Gegensatz zu der der Reaktion der Enzyme der Wirbellosen. Da jedoch für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion noch keine mathematische Beziehung zwischen Umsatz und Inkubationszeit aufgestellt werden konnte, mußten die Enzymaktivitäten bei der Ermittlung kinetischer Parameter durch Endpunktsbestimmung (vgl. Abs. 4.3.1.2.) bestimmt werden.

4.3.2. β -N-Acetylglucosaminidase und

4.3.3. Saure Phosphatase

wurden nach der von Sandhoff et al. (120) angegebenen Methode mit p-Nitrophenyl- β -D-acetylglucosaminid bzw. p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt, ohne Berücksichtigung der optimalen Bedingungen für die beiden Enzyme der untersuchten Tierspecies.

4.4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Suspensionen und konzentrierten Lösungen wurde nach der Methode von Lowry et al. (84), der verdünnter Lösungen durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm (143) gemessen. Als Standard diente kristallisiertes Rinderserumalbumin.

4.5. Trennung multipler Formen und Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Sulfatasen

Die Trennung multipler Formen der Sulfatasen und die Bestimmung deren isoelektrischen Punkte erfolgte mittels Elektrofokussierung im Saccharose-Dichtegradienten nach der Methode von Vesterberg und Svensson (141). Die Säulen (Säule 8101 der Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden, Trennvolumen 110 ml oder analytische Säule nach Harzer (63), Trennvolumen: 15 ml) wurden mit Enzymlösungen, die gegen Wasser (dest.) dialysiert (25 Stdn., 4°C) und zentrifugiert (37000 x g, Rotor SS 34, Sorvall RC2-B, 30 Min.) worden waren, beladen. Zur Ausbildung des pH-Gradienten dienten LKB-Trägerampholyte für den pH-Bereich 3 - 10 in einer Konzentra-

tion von 1 - 2 % (Gew./Vol.) im Fokussierraum. Die Spannung wurde in den ersten 20 Stdn. langsam auf 800 V gesteigert, ohne daß die Leistung 1 - 1,5 W überstieg. Am Ende des Laufes hatte sich bei einer Spannung von 820 V eine Stromstärke von 1,5 - 2,5 mA (LKB-Säule 8101) bzw. 0,2 - 0,3 mA (analytische Säule nach Harzer) eingestellt. Nach 50 - 70 Stdn. wurde der Säulinhalt fraktioniert (Fraktionsvolumen: 1,5 bzw. 0,25 ml). Der pH-Wert der Fraktionen wurde mit einem pH-Meter, Typ PHM 26C, in Verbindung mit einer Mikroelektrodeneneinheit, Typ E 5021 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bei 20°C gemessen.

Die Bestimmung der Ausbeute nach Elektrofokussierung der Enzyme wurde getrennt für die saure und basische Form am Beispiel der Sulfatase aus Rattengewebe durchgeführt. Nach einer Fokussierdauer von 20, 40 und 60 Stdn. wurden 108, 97 und 105 % (saure Form) bzw. 93, 99 und 97 % (basische Form) der eingesetzten Enzymmenge wiedergefunden. Im Gegensatz zu rohen Enzympräparationen wurden bei teilangereicherten Enzymen erhebliche Verluste an Enzymaktivität nach Fokussierung festgestellt; diese Beobachtung läßt sich wahrscheinlich durch eine geringere Schutzwirkung durch Fremdproteine in angereicherten Präparaten zurückführen.

Die Genauigkeit der Bestimmung des Verhältnisses von saurer und basischer Form der Sulfatasen wurde durch Parallelfokussierung (sechs Bestimmungen) der Enzyme aus Rattengewebe geprüft. Das Peakverhältnis dazu wurde durch Summation der zugehörigen Einzelextinktionen gewonnen. Dabei wurden für die saure bzw. basische Form der Sulfatasen als Mittelwerte 37,8 bzw. 62,2 % der Gesamtaktivität mit Standardabweichungen von $\pm 2,2$ bzw. $\pm 2,1$ gefunden, was relativen Fehlern der Einzelmessungen von 5,7 bzw. 3,3 % entspricht.

4.6. Trennung oligomerer Formen und Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte der Sulfatasen

Die Auftrennung oligomerer Formen und die Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte der Sulfatasen erfolgte durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 nach der Methode von Andrews (3,4) in zwei verschiedenen Puffersystemen in Anwesenheit von Triton X-100. Die Säulen (1,6 x 95 cm) wurden mit 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0 bzw. 0,05 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure-Puffer, pH 7,5, jeweils 0,1 %-ig an Triton X-100, äquilibriert und mit Proteinen bekannten Molekulargewichts (Myoglobin vom Pferd, MG 17800; Chymotrypsinogen A, MG 25000; Albumin aus Hühnerei, MG 45000; Albumin aus Rinderserum, MG 67000; Aldolase,

MG 147000; γ -Globulin aus Humanserum, MG 160000 und Katalase, MG 240000) kalibriert. Das äußere Volumen des Gelbettes wurde mit Dextranblau 2000 bestimmt. Die Protein- bzw. Enzymproben wurden in 0,5 - 1,0 ml Elutionspuffer auf die Säulen aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Als Elutionsvolumen wurde das Volumen vom Start bis zum Wendepunkt im Anstieg der Elutionskurve gemessen (Pufferdurchfluß: 3,6 ml/Stde., Fraktionsvolumen: 1,8 ml). Das Elutionsverhalten der Eichproteine bzw. der Sulfatasen wurde gemäß der Beziehung V_e/V_o (V_e = Elutionsvolumen des Proteins bzw. der Sulfatase; V_o = Elutionsvolumen von Dextranblau 2000) charakterisiert.

4.7. Bestimmung der Thermostabilität der Sulfatasen

Zur Bestimmung der Thermostabilität wurden Aliquote der Enzymfraktionen in ungepufferter, wäßriger Lösung 30 Min. bei 40, 50, 60, 70 und 80°C inkubiert.

4.8. Nachweis der Glykoproteinnatur der Sulfatasen

Der Nachweis der Glykoproteinnatur der Sulfatasen erfolgte durch Gelchromatographie an Biogel P-200 in Ab- und Anwesenheit von Concanavalin A. Folgende drei Elutionsmittel wurden verwendet: (a) 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0, 1,0 M an Natriumchlorid und 1,0 mM an Magnesium-, Calcium- und Manganchlorid; (b) 0,1 % (Gew./Vol.) Concanavalin A in Elutionspuffer (a); (c) 0,1 % (Gew./Vol.) Concanavalin A und 2,0 % (Gew./Vol.) Methyl- α -D-glucopyranosid in Elutionsmittel (a). Die Enzymlösungen (20 - 25 μ l) wurden 1:1 mit dem jeweiligen Elutionsmittel doppelter Konzentration gemischt, auf die Säule (Säulendimension: 1 x 24 cm) aufgetragen und mit dem entsprechenden Elutionspuffer eluiert (Durchfluß: 1,2 ml/Stde.; Fraktionsvolumen: 0,2 ml). Die Bestimmung des äußeren Volumens (V_o) der Säulenfüllung erfolgte mit Dextranblau 2000. Das Elutionsvolumen wurde vom Maximum der Elutionskurve aus berechnet.

4.9. Anreicherung der Sulfatasen

Ausgangsmaterial für die Anreicherung der Sulfatasen waren der Gesamtorganismus (Wirbellose) bzw. das Gehirn und die Nieren (Ratte) der Tiere. Die Organismen bzw. Gewebe wurden bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung in einigen Fällen mehrere Monate bei -20°C gelagert. Soweit nicht anders angegeben werden alle Aufarbeitungsschritte bei 0 - 4°C durchgeführt.

(a) Homogenisation. Die Gewebe, soweit nötig von Schalen und Hartteilen befreit, wurden zerkleinert und mit 49, 9 oder 4 Vol. (entsprechend einem 2, 10 oder 20 %-igen Homogenat, Gew./Vol.) Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,5, 0,2 %-ig an Triton X-100) homogenisiert (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel, Staufen), die Homogenate anschließend eine Stunde bei ca. 20°C gerührt.

(b) Extraktion. Durch Zentrifugation der Gewebssuspension (30 Min., 20000 U/Min., Rotor SS 34 oder 13000 U/Min., Rotor GSA, Sorvall RC2-B, Norwalk, Conn., USA) wurden ein roher Extrakt und ein Präzipitat gewonnen. Letzteres wurde nochmals mit 2 Vol. Puffer in der eben beschriebenen Weise nachextrahiert.

(c) Aceton-Fällung. Die vereinigten Überstände wurden einer Aceton-Fällung bei -5°C unterzogen. Die durch etwa 40 - 70 % (Vol./Vol.) Acetonzusatz (die geeigneten Konzentrationen wurden durch Vorversuche ermittelt) gefällte Fraktion (Zentrifugation: 30 Min., 13000 U/Min., Rotor GSA) wurde in Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,5, 0,2 %-ig an Triton X-100) aufgenommen, 1 Stde. gerührt und erneut zentrifugiert (30 Min., 20000 U/Min., Rotor SS 34) und gegen den gleichen Puffer dialysiert (40 Stdn., mehrere Wechsel).

(d) Ammoniumsulfat-Fällung. Die Enzymfraktion zwischen etwa 45 und 75 %-iger Ammoniumsulfat-Sättigung (20 - 22°C; die notwendigen Konzentrationen wurden für die untersuchten Species jeweils durch Vorversuche ermittelt) wurde wie unter (c) beschrieben extrahiert und gegen Wasser (dest.) dialysiert (40 Stdn., mehrere Wechsel). Die benötigten Mengen Ammoniumsulfat wurden dem Nomogramm von Dixon (34) entnommen.

(e) Elektrofokussierung. Die dialysierte Enzymlösung wurde nach der Vorschrift von Vesterberg und Svensson (141) im Saccharosedichtegradienten mit LKB-Trägerampholyten für den pH-Bereich 3 - 10 bei 10 - 12°C isoelektrofokussiert (Säulen: LKB 8101 mit 110 ml oder LKB 8102 mit 440 ml Trennvolumen; LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden). Die genauen Bedingungen wurden bereits unter Abs. 3.5. beschrieben. Der Säulinhalt wurde nach Beendigung der Fokussierung (70 - 80 Stdn.) fraktioniert (Fraktionsvolumen 1,5 bzw. 5 ml), die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,5, 0,1 %-ig an Triton X-100) dialysiert (40 Stdn., mehrere Wechsel).

(f) Gelchromatographie. Die Enzymfraktionen wurden mittels Ultrafiltration eingeengt (Sartorius Membranfilter, Göttingen) (127), vom Ungelösten abzentrifugiert (30 Min., 40000 U/Min., Rotor 50Ti, Spinco L-2,

Beckman, Palo Alto, Calif., USA) und in Teilen von 10 - 15 ml an Sephadex G-200 chromatographiert. Die Säule (5 x 52 cm) wurde vorher mit Natriumacetat-Puffer (0,2 M, pH 5,0, 0,1 %-ig an Triton X-100) äquilibriert und anschließend mit dem gleichen Puffer eluiert (Durchfluß: 8,3 ml/Stde., Fraktionsvolumen: 8,3 ml). Fraktionen mit mindestens einem Viertel der maximalen Aktivität werden vereinigt, gegen Wasser (dest.) dialysiert (40 - 50 Stdn., mehrere Wechsel) und mittels

(g) Membranfiltration vom freien Triton X-100 befreit und auf ein Volumen von 2 - 5 ml eingengt.

Die Enzymlösungen wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die sauren, besonders aber die basischen Formen der Sulfatase (vgl. Abs. 2.2.1.1.) verloren bei den verwendeten Lagerbedingungen an Aktivität.

Die Anreicherung der Sulfatasen der Wirbellosen erfolgte zweimal in unterschiedlicher Weise. Eine erste Aufarbeitungsreihe setzte sich aus den Schritten (a), (b), (c), (e) und (g) zusammen. Die danach erhaltenen Enzyme dienten zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte, der Thermostabilität und zur Untersuchung der katalytischen Eigenschaften. Eine zweite Aufarbeitungsreihe erfolgte unter Verzicht auf Schritt (e), da sich gezeigt hatte, daß teilangereicherte Enzyme, im Gegensatz zu rohen Extrakten, nur unter größerem Verlust an Enzymaktivität elektrofokussiert werden können (93). Die so gewonnenen Enzyme wurden zur Untersuchung der Glykoproteinnatur und der oligomeren Formen der Sulfatasen verwendet. Die Präparation der Sulfatasen aus Rattengewebe erfolgte unter Verzicht auf Aufarbeitungsschritte (c) und (d).

Nach dem letzten Reinigungsschritt wiesen die gewonnenen Enzymlösungen, soweit geprüft, noch größere Mengen an Fremdproteinen auf, wie sich mit Hilfe von Polyacrylamidgelelektrophorese (Flachdisk-Elektrophorese-Apparat 146200, Desaga, Heidelberg) nach Ornstein (103) und Davis (27) an einem 7,5 %-igem Trenngel (Tris/Veronal-Puffer, 0,01 M, pH 7,5; Stromstärke: 45 mA, Laufzeit: 70 Min.; Bromphenolblau, $1 \times 10^{-6} \%$, als Marker, Coomassie Brilliant Blau als Färbereagens) zeigen ließ.

Die Bestimmung der Gesamtaktivitäten der drei sauren Hydrolasen Arylsulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und saure Phosphatase und die Untersuchung des Verhältnisses von saurer und basischer Form der Sulfatase während des postnatalen Abschnitts der Ontogenie der Ratte erfolgte in Anschluß an Aufarbeitungsschritt (a) bzw. (b).

4.10. Gewebefraktionierung

Die Gewebefraktionierung erfolgte nach dem von Koenig et al. (77, 78) modifizierten Aufarbeitungsschema von DeRobertis et al. (111) durch Kombination einer Differentialzentrifugation mit einer isopyknischen Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten. Sämtliche Aufarbeitungsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt. Die angegebenen Zentrifugalkräfte beziehen sich auf die halbe Höhe des Zentrifugenbechers als Einwirkungsort.

Weiße Laboratoriumsratten verschiedenen Alters wurden durch Dekapitieren getötet, die Gehirne schnell entnommen, gewogen, in 9 Vol. (Gew./Vol.) 0,32 M Saccharoselösung gegeben und grob zerkleinert. Die sich anschließende Homogenisation der Gewebe erfolgte mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit lose eingepaßtem Teflon-Pistill mit einer einzigen Auf- und Abwärtsbewegung des Gefäßes gegen das rotierende Pistill (1500 U/Min.).

Das Homogenat wurde 10 Min. bei 800 x g zentrifugiert (Rotor SE 12, Sorvall RC2-B) und das gewonnene Präzipitat, das die Zellkerne, intakte Zellen, Gefäßfragmente und verschiedene Zellbruchstücke enthielt, wurde als Kernfraktion (N) bezeichnet. Der erhaltene Überstand wurde anschließend 20 Min. bei 15600 x g zentrifugiert (Rotor SE 12), wobei die rohe Mitochondrienfraktion (M) als Präzipitat abgetrennt wurde. Der resultierende Überstand wurde erneut zentrifugiert (90 Min., 100000 x g; Rotor 50Ti, Beckman Spinco L-2), wodurch wiederum ein Präzipitat, die Mikrosomenfraktion (P), und ein Überstand, die lösliche Fraktion (S), gewonnen wurden.

Die rohe Mitochondrienfraktion (M) wurde im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten weiter subfraktioniert. Der Gradient wurde durch Unterschichten von jeweils 10 ml 0,8, 1,0, 1,2 und 1,4 M Saccharoselösung in Cellulosenitrat-Zentrifugenröhrchen vorbereitet und Fraktion M, in 0,32 M Saccharoselösung resuspendiert, überschichtet. Die sich anschließende Zentrifugation (120 Min., 63500 x g) wurde im Spinco-Rotor 25.2. (Beckman Spinco L-2) durchgeführt. Die vier erhaltenen Schichten, als Fraktion A (0,32 - 0,8 M), B (0,8 - 1,0 M), C (1,0 - 1,2 M) und D (1,2 - 1,4 M) bezeichnet, und ein Präzipitat, als Fraktion E bezeichnet, wurden durch vorsichtiges Abpipettieren voneinander getrennt.

Die Fraktionen N, M, P und E wurden in 0,2 %-iger Triton X-100-Lösung aufgenommen, die Fraktionen S, A, B, C und D wurden mit 1,0 %-iger Triton X-100-Lösung versetzt (Endkonzentration 0,2 %) und anschließend

gegen 0,2 %-ige wäßrige Triton X-100-Lösung dialysiert (40 Stdn., mehrere Wechsel), um eine weitgehende Freisetzung der partikelgebundenen sauren Hydrolasen zu erreichen (42, 144), bevor eine biochemische Analyse durchgeführt wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Arylsulfatasen einiger Vertreter der folgenden Tierstämme wurden isoliert und näher charakterisiert: Porifera (Schwämme), Cnidaria (Nesseltiere), Mollusca (Weichtiere), Annelida (Ringelwürmer), Arthropoda (Gliedertiere), Echinodermata (Stachelhäuter), Tunicata (Manteltiere) und Vertebrata (Wirbeltiere).

2. Es konnte gezeigt werden, daß die Arylsulfatasen der Avertebraten ebenso wie die der Vertebraten mittels isoelektrischer Fokussierung in multiple Formen, d.h. in wenigstens eine saure und eine basische Enzymfraktion, aufgetrennt werden können, wobei die sauren Formen im allgemeinen überwiegen.

3. Ebenso wie bei Vertebraten zeigt auch bei Avertebraten die saure Form der Sulfatase Cerebrosidsulfatase-Aktivität, obwohl das Vorkommen von Cerebrosidsulfat bei Avertebraten noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte.

4. Mit Hilfe von Concanavalin A ließ sich nachweisen, daß die Sulfatasen der Avertebraten, ebenso wie die der Vertebraten, Glykoproteine sind.

5. Der Nachweis eines einheitlichen Molekulargewichts und eines ähnlichen isoelektrischen Punktes der kleinsten, enzymatisch aktiven Untereinheit der sauren Form der Sulfatase deutet auf eine nahe strukturelle Verwandtschaft und einen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang hin.

6. Die Annahme eines phylogenetischen Zusammenhangs der sauren Formen der Sulfatase wird unterstützt durch den Nachweis sehr ähnlicher Eigenschaften der katalytischen Reaktion der Enzyme, untersucht sowohl mit Nitrocatecholsulfat als auch Cerebrosidsulfat als Substrat.

7. Der Abbau von Cerebrosidsulfat durch rohe Sulfatasepräparate geht sowohl bei Vertebraten als auch bei Avertebraten bis zur Stufe des

Ceramids weiter. Da diese Schritte bei Vertebraten durch Enzyme katalysiert werden, die sich in den Lysosomen befinden, ist zu vermuten, daß lysosomenähnliche Organellen auch bei Avertebraten vorkommen.

8. Diese Vermutung wird unterstützt durch den Nachweis weiterer "lysosomaler" Enzyme in den Geweben der Avertebraten und deren Glykoprotein-natur.

9. Im Rattengehirn zeigt sich, daß schon vor der Myelinisierung, also vor dem Auftreten des Myelinbausteins Cerebrosidsulfat, die saure Form der Sulfatase nachzuweisen ist. Dies entspricht auf ontogenetischer Ebene bei Vertebraten dem, was auf phylogenetischer Ebene bei Avertebraten gezeigt werden konnte.

10. Während der Myelinisierung im Rattengehirn läßt sich eine gesteigerte Synthese von Cerebrosidsulfat mit einer erhöhten Synthese des abbauenden Enzyms korrelieren. Dieser überraschende Befund wird in Zusammenhang mit der Regulation der Membranbiosynthese diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abramson, M.B., Katzman, R., Curci, R., Wilson, C.E., *Biochemistry* 6, 295-304 (1967).
- 2) Ahmad, A., Bishayee, S., Bachhawat, B.K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 730-6 (1973).
- 3) Andrews, P., *Biochem. J.* 91, 222-33 (1964).
- 4) Andrews, P., *Biochem. J.* 96, 595-606 (1965).
- 5) Austin, J.H., Balasubramanian, A.S., Pattabiraman, T.N., Saraswathi, S., Basu, D.K., Bachhawat, B.K., *J. Neurochem.* 10, 805-16 (1963).
- 6) Balazs, R., Brooksbank, B.W.L., Patel, A.J., Johnson, A.L., Wilson, D.A., *Brain Res.* 30, 273-93 (1971).
- 7) Barrett, A.J., in: *Lysosomes in Biology and Pathology* (Dingle, J.T., Fell, H.B., Hg.), Bd. 2, S. 245-312, Amsterdam, London: North-Holland. 1969.
- 8) Barrett, A.J., *Histochem. J.* 3, 213-21 (1971).
- 9) Baum, H., Dodgson, K.S., Spencer, B., *Biochem. J.* 69, 567-72 (1958).
- 10) Baum, H., Dodgson, K.S., *Biochem. J.* 69, 573-82 (1958).
- 11) Baum, H., Dodgson, K.S., Spencer, B., *Clin. Chim. Acta* 4, 453-55 (1959).
- 12) Bishayee, S., Bachhawat, B.K., *Biochim. Biophys. Acta* 334, 378-88 (1974).
- 13) Bleecken, S., Kaufmann, G., Kummer, K., *J. Chromatog.* 19, 105-13 (1965).
- 14) Bleszynski, W., Dzialoszynski, L.M., *Biochem. J.* 97, 360-4 (1965).
- 15) Bleszynski, W.S., Roy, A.B., *Biochim. Biophys. Acta* 317, 164-71 (1973).
- 16) Blix, G., *Z. Physiol. Chem.* 219, 82 (1933).
- 17) Bowen, D.M., Radin, N.S., *J. Neurochem.* 16, 501-11 (1969).
- 18) Bullock, T.H., in: *The Neurosciences. Third Study Program* (Schmitt, F.O., Worden, F.G., Hg.), S. 343-46, Cambridge, London: Massachusetts Inst. Technol. 1974.
- 19) Bunge, R.P., in: *The Neurosciences. Second Study Program* (Schmitt, F.O., Hg.), S. 782-97, New York: The Rockefeller Univ. Press. 1970.
- 20) Cheetham, R.D., Morré, D.J., Yunghans, W.N., *J. Cell Biol.* 44, 492-500 (1970).
- 21) Cinader, B., in: *Antibodies to Biologically Active Molecules* (Cinader, B., Hg.), S. 85-137, Oxford: Pergamon. 1967.

- 22) Clarke, A.E., Denborough, M.A., *Biochem. J.* 121, 811-16 (1971).
- 23) Clendenon, N.R., Allen, N., *J. Neurochem.* 17, 865-79 (1970).
- 24) Clouet, D.H., Gaitonde, M.K., *J. Neurochem.* 1, 126-33 (1956).
- 25) Cuzner, M.L., Davison, A.N., Gregson, N.A., *J. Neurochem.* 12, 469-81 (1965).
- 26) Dallner, G., Siekevitz, P., Palade, G.E., *J. Cell Biol.* 30, 97-117 (1966).
- 27) Davis, B.J., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427 (1964).
- 28) Davis, D.A., Bogitsh, B., *Exp. Parasitol.* 29, 302-8 (1971).
- 29) Davison, A.N., Gregson, N.A., *Biochem. J.* 85, 558-568 (1962).
- 30) Davison, A.N., Gregson, N.A., *Biochem. J.* 98, 915-22 (1966).
- 31) Derrien, M., *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 9, 110 (1911).
- 32) Dingle, J.T., Fell, H.B. (Hg.), *Lysosomes in Biology and Pathology*, Bd. 1 und 2, Amsterdam, London: North-Holland. 1969.
- 33) Dingle, J.T. (Hg.), *Lysosomes in Biology and Pathology*, Bd. 3, Amsterdam, London: North-Holland. 1973.
- 34) Dixon, M., *Biochem. J.* 54, 457 (1953).
- 35) Dodgson, K.S., Lewis, J.I.M., Spencer, B., *Biochem. J.* 55, 253-59 (1953).
- 36) Dodgson, K.S., Spencer, B., Thomas, J., *Biochem. J.* 56, 177-81 (1954).
- 37) Dodgson, K.S., Spencer, B., Thomas, J., *Biochem. J.* 57, XXI (1954).
- 38) Dodgson, K.S., Spencer, B., in: *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D., Hg.), Bd. IV, S. 211-255, New York, London: Interscience Publishers. 1957.
- 39) Dodgson, K.S., Powell, G.M., *Biochem. J.* 73, 666-71 (1959).
- 40) Dodgson, K.S., *Enzymologia* 20, 301-312 (1959).
- 41) Dolly, J.O., Dodgson, K.S., Rose, F.A., *Biochem. J.* 128, 337-45 (1972).
- 42) Duve, C. de, Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., *Biochem. J.* 60, 604-17 (1955).
- 43) Farooqui, A.A., Bachhawat, B.K., *J. Neurochem.* 18, 635-46 (1971).
- 44) Farooqui, A.A., Bachhawat, B.K., *J. Neurochem.* 20, 889-91 (1973).
- 45) Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
- 46) Fromageot, C., *Ergebn. Enzymforsch.* 7, 50 (1938).
- 47) Fromageot, C., in: *The Enzymes* (Sumner, J.B., Myrback, K., Hg.), Bd. 1, New York: Acad. Press. 1950.
- 48) Fujino, Y., Negishi, T., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 225-229 (1957).
- 49) Futai, M., Tsung, P.K., Mizuno, D., *Biochim. Biophys. Acta* 261, 508-16 (1972).
- 50) Gammack, D.B., Perrin, J.H., Saunders, L., *Biochim. Biophys. Acta* 84, 576-86 (1964).
- 51) Gatt, S., *J. Biol. Chem.* 241, 3724-30 (1966).
- 52) Gatt, S., *Science* 164, 1422-3 (1969).

- 53) Gatt, S., Barenholz, Y., Borkovski-Kubiler, I., Leibovitz-Ben Gershon, Z., in: *Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders* (Volk, B.W., Aronson, S.M., Hg.), S. 237-56, New York, London: Plenum. 1972.
- 54) Gatt, S., Barenholz, Y., *Ann. Rev. Biochem.* 42, 61-90 (1973).
- 55) Gilliland, K.M., Moscatelli, E.A., *Biochim. Biophys. Acta* 187, 221-29 (1969).
- 56) Goldstein, I.J., Hollerman, C.E., Merrick, J.M., *Biochim. Biophys. Acta* 97, 68-76 (1965).
- 57) Gottschalk, A. (Hg.), *Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function*, Amsterdam: Elsevier. 1972.
- 58) Graham, E.R.B., Roy, A.B., *Biochim. Biophys. Acta* 329, 88-92 (1973).
- 59) Green, J.P., Robinson, Jr., J.D., *J. Biol. Chem.* 235, 1621-24 (1960).
- 60) Grove, S.N., Bracker, C.E., Morr , D.J., *Science* 161, 171-73 (1968).
- 61) Hajra, A.K., Bowen, D.M., Kishimoto, Y., Radin, N.S., *J. Lipid. Res.* 7, 379-86 (1966).
- 62) Harada, T., Spencer, B., *Biochem. J.* 93, 373-78 (1964).
- 63) Harzer, K., *Z. Anal. Chem.* 252, 170-74 (1970).
- 64) Harzer, K., Stinshoff, K., Mr z, W., Jatzkewitz, H., *J. Neurochem.* 20, 279-87 (1973).
- 65) Harzer, K., Sandhoff, K., *J. Neurochem.* 18, 2041-50 (1971).
- 66) Hauser, G., *J. Neurochem.* 15, 1237-38 (1968).
- 67) Honegger, C.G., Freyvogel, T.A., *Helvetica Chim. Acta* 46, 2265-70 (1963).
- 68) Hunter, G.C., Millson, G.C., *J. Neurochem.* 13, 375-83 (1966).
- 69) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 852-54 (1972).
- 70) Jackson, C., Black, R.E., *Biol. Bull.* 132, 1-15 (1967).
- 71) Jatzkewitz, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 311, 279-82 (1958).
- 72) Jatzkewitz, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 318, 265-77 (1960).
- 73) Jatzkewitz, H., in: *Lipoide - 16. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 28./30. April 1965 in Mosbach/Baden*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1966.
- 74) Jatzkewitz, H., Stinshoff, K., *FEBS Letters* 32, 129-31 (1973).
- 75) Jerfy, A., Roy, A.B., *Biochim. Biophys. Acta* 293, 178-190 (1973).
- 76) Kishimoto, Y., Davies, W.E., Radin, N.S., *J. Lipid. Res.* 6, 532-36 (1965).
- 77) Koenig, H., Gaines, D., McDonald, T., Gray, R., Scott, I., *J. Neurochem.* 11, 729-43 (1964).
- 78) Koenig, H., *Methods Enzymol.* 31/A, 457-77 (1974).
- 79) Komai, Y., Matsukawa, S., Satake, M., *J. Biochem. (Tokyo)* 70, 367-9 (1971).
- 80) Lapetina, E.G., Soto, E.F., DeRobertis, E., *J. Neurochem.* 15, 437-45 (1968).
- 81) Lineweaver, H., Burk, D., *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658-66 (1934).
- 82) Lipovac, V., Barton, N. Rosenberg, A., *Biochemistry* 12, 1858-61 (1973).

- 83) Lowenstein, J.M. (Hg.), *Methods Enzymol.* 14, New York: Acad. Press. 1969.
- 84) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265-75 (1951).
- 85) McCubbin, W.D., Kay, C.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 101-109 (1971).
- 86) McKhann, G.M., Ho, W., *J. Neurochem.* 14, 717-24 (1967).
- 87) Mehl, E., Jatzkewitz, H., *Naturwiss.* 50, 227-29 (1963).
- 88) Mehl, E., Jatzkewitz, H., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 339, 260-76 (1964).
- 89) Mehl, E., Jatzkewitz, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 407-11 (1965).
- 90) Mehl, E., Jatzkewitz, H., *Biochim. Biophys. Acta* 151, 619-27 (1968).
- 91) Milsom, D.W., Rose, F.A., Dodgson, K.S., *Biochem. J.* 109, 40P (1968).
- 92) Mraz, W., Fischer, G., Jatzkewitz, H., in Vorbereitung.
- 93) Neuwelt, E., Stumpf, D., Austin, J., Kohler, P., *Biochim. Biophys. Acta* 236, 333-46 (1971).
- 94) Nichol, L.W., Roy, A.B., *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 643-51 (1964).
- 95) Nichol, L.W., Roy, A.B., *Biochemistry* 4, 386-96 (1965).
- 96) Nichol, L.W., Roy, A.B., *Biochemistry* 5, 1379-88 (1966).
- 97) Nicholls, R.G., Roy, A.B., in: *The Enzymes* (Boyer, P.D., Hg.), Bd. 5, S. 21-41, New York, London: Acad. Press. 1971.
- 98) Nicolson, G.L., *Int. Rev. Cytol.* 39, 89-190 (1974).
- 99) Noren, R., Svennerholm, L., *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 9, 225-34 (1973).
- 100) O'Connor, J.D., Polito, A.J., Monroe, R.E., Sweeley, C.C., Bieber, L.L., *Biochim. Biophys. Acta* 202, 195-97 (1970).
- 101) Öhman, R., Rosenberg, A., Svennerholm, L., *Biochemistry* 9, 3774-82 (1970).
- 102) Olson, M.O.J., Liener, I.E., *Biochemistry* 6, 3801-8 (1967).
- 103) Ornstein, L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-49 (1964).
- 104) Percy, A.K., Farrel, D.F., Kaback, M.M., *J. Neurochem.* 19, 233-36 (1972).
- 105) Perlmann, P., Nilsson, H., Leon, M.A., *Science* 168, 1112-15 (1970).
- 106) Peters, A., Vaughn, J.E., in: *Myelination* (Davison, A.N., Peters, A., Hg.), S. 3-79, Springfield: Charles C. Thomas. 1970.
- 107) Pitts, Jr., F.N., Quick, C., *J. Neurochem.* 14, 561-70 (1967).
- 108) Porter, M.T., Fluharty, A.L., De La Flor, S.D., Kihara, H., *Biochim. Biophys. Acta* 258, 769-78 (1972).
- 109) Quinn, P.J., Sherman, W.R., *Biochim. Biophys. Acta* 233, 734-52 (1971).
- 110) Reinisova, J., Michalec, C., *Comp. Biochem. Physiol.* 19, 581-8 (1966).
- 111) DeRobertis, E., Pellegrino De Iraldi, A., Rodriguez De Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., *J. Neurochem.* 9, 23-35 (1962).
- 112) Roy, A.B., *Biochem. J.* 53, 12-15 (1953).
- 113) Roy, A.B., *Biochem. J.* 77, 380-86 (1960).

- 114) Roy, A.B., Jerfy, A., *Biochim. Biophys. Acta* 207, 156-64 (1970).
- 115) Roy, A.B., in: *The Enzymes* (Boyer, P.D., Hg.), Bd. 5, S. 1-19, New York, London: Acad. Press. 1971.
- 116) Roy, A.B., *Biochim. Biophys. Acta* 227, 129-38 (1971).
- 117) Sandhoff, K., Harzer, K., Jatzkewitz, H., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 349, 283-87 (1968).
- 118) Sandhoff, K., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 349, 1095-98 (1968).
- 119) Sandhoff, K., *FEBS Letters* 11, 342-44 (1970).
- 120) Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., Jatzkewitz, H., *J. Neurochem.* 18, 2469-89 (1971).
- 121) Sellinger, O.Z., Rucker, D.L., DeBalbian Vester, F., *J. Neurochem.* 11, 271-80 (1964).
- 122) Sellinger, O.Z., Hiatt, R.A., *Brain Res.* 7, 191-200 (1968).
- 123) Small, D.M., *Fed. Proc.* 29, 1320-26 (1970).
- 124) Smith, E.L., in: *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* (van Thoai, N., Roche, J., Hg.), S. 43-67, New York: Gordon and Breach. 1968.
- 125) Smith, E.L., in: *The Enzymes* (Boyer, P.D., Hg.), Bd. 1, S. 267-339, New York, London: Acad. Press. 1970.
- 126) Snyder, F., Stephens, N., *Anal. Biochem.* 4, 128-31 (1962).
- 127) Sober, H.A., Gutter, F.J., Wycoff, M.M., Peterson, E.A., *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 756-63 (1956).
- 128) Spencer, B., *Biochem. J.* 69, 155-59 (1958).
- 129) Stinshoff, K. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 475-90 (1972).
- 130) Stinshoff, K., *Dissertation, Universität München.* 1974.
- 131) Stoffyn, P., Stoffyn, A., *Biochim. Biophys. Acta* 70, 218-20 (1963).
- 132) Stoffyn, P., *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 43, 69-74 (1966).
- 133) Stumpf, D.A., Austin, J.H., *Trans. Amer. Neurol. Ass.* 97, 29-32 (1972).
- 134) Suzuki, K., *J. Neurochem.* 12, 969-79 (1965).
- 135) Svennerholm, L., *J. Neurochem.* 10, 613-23 (1963).
- 136) Tettamanti, G., *Advan. Exp. Med. Biol.* 13, 75-89 (1971).
- 137) Tiffon, Y., Rasmont, R., DeVos, L., Bouillon, J., in: *Lysosomes in Biology and Pathology* (Dingle, J.T., Hg.), Bd. 3, S. 49-85, Amsterdam, London: North-Holland. 1973.
- 138) Vanier, M.T., Holm, M., Öhman, R., Svennerholm, L., *J. Neurochem.* 18, 581-92 (1971).
- 139) Vaskovskii, V.E., Kostetskii, E.Y., Svetashev, V.I., Zhukova, I.G., Smirnova, G.P., *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 163-77 (1970).
- 140) Vaughn, J.E., *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 94, 293 (1969).
- 141) Vesterberg, O., Svensson, H., *Acta Chem Scand.* 20, 820-34 (1966).
- 142) Wacker, A., Träger, L., *Angew. Chem.* 72, 168 (1960).
- 143) Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.* 310, 384 (1941).
- 144) Wattiaux, R., De Duve, C., *Biochem. J.* 63, 606-08 (1956).

- 145) Weinreb, N.J., Brady, R.O., Tappel, A.L., *Biochim. Biophys. Acta* 159, 141-46 (1968).
- 146) Wells, M.A., Dittmer, J.C., *Biochemistry* 6, 3169-75 (1967).
- 147) Wiegandt, H., *J. Neurochem.* 14, 671-74 (1967).
- 148) Wieland, T., Pfeleiderer, G., *Angew. Chem.* 74, 261-70 (1962).
- 149) Wieme, R.J., in: *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* (van Thoai, N., Roche, J., Hg.), S. 19-40, New York: Gordon and Breach. 1968.
- 150) Winzor, D.J., Scheraga, H.A., *Biochemistry* 2, 1263-67 (1963).
- 151) Worwood, M., Dodgson, K.S., Hook, G.E.R., Rose, F.A., *Biochem. J.* 134, 183-90 (1973).
- 152) Yamakawa, T., Kiso, N., Handa, S., Makita, A., Yokojava, S., *J. Biochem.* 52, 226 (1962).

LEBENS LAUF

Eltern, Geburt. Am 9. Dezember 1940 wurde ich, Wilfried Mraz, als Sohn von Wilhelm Mraz, Versicherungskaufmann, und Ilse Mraz, geb. Hübner, in Reichenberg geboren.

Schul Ausbildung. Von 1947 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Angersdorf b. Halle/Saale, Berlin und Kempten/Allgäu, von 1953 bis 1962 die Oberrealschule in Kempten/Allgäu und München. Im Juli 1962 legte ich in München das Abitur ab.

Universitätsstudium. Im Wintersemester 1962/63 immatrikulierte ich mich zum Studium der Chemie an der Universität München, im Sommersemester 1964 setzte ich mein Studium in den Fächern Chemie und Biologie fort und legte im Frühjahr 1969 die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in München ab.

Verehelichung. Am 5. Januar 1970 heiratete ich Renate Lettau, Studienrätin.

Dissertation. In der Zeit von Oktober 1970 bis September 1974 fertigte ich, nach einer Arbeit über die Sulfatase A bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie, die vorliegende Dissertation unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. H. Autrum und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München an.

Im Januar 1972 wurde mir die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie übertragen.

